

DAS SPEZIFISCHE VOLUMEN VON
RINDERSERUMALBUMIN - SALZ - LÖSUNGEN

von
Klaus Nopitsch
aus
Nürnberg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546216_0093

DAS SPEZIFISCHE VOLUMEN VON RINDERSERUMALBUMIN - SALZ - LÖSUNGEN

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Klaus Nopitsch

aus

Nürnberg

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juli 1981

Vorsitzender der Promotionskommission: Professor Dr.H.Wegener

Erstberichterstatter: Professor Dr.Dr.H.Pauly

Zweitberichterstatter: Professor Dr.K.Müller

Drittberichterstatter: Professor Dr.R.Helbig

1. Einleitung	1
1.1 Problemstellung	1
1.2 Ziel der Arbeit	1
2. Methodik	3
2.1 Herstellung der Proben	3
2.1.1 Rinderserumalbumin (RSA)	3
2.1.2 Salze	4
2.2 Messung des spezifischen Volumens	4
2.3 Bestimmung der Massenanteile	4
2.4 Fehlerbetrachtung	6
2.4.1 Fehler bei der Dichtebestimmung	6
2.4.2 Fehler bei der Massebestimmung	9
3. Mathematische Beschreibung des spezifischen Volumens ternärer Mischungen	10
4. Messungen	14
4.1 Wasser-RSA-Mischungen	14
4.2 Wasser-Salz-Mischungen	17
4.3 Wasser-RSA-Salz-Mischungen	24
4.3.1 Wasser-RSA-KCl-Mischungen	24
4.3.2 Wasser-RSA-KJ-Mischungen	27
4.3.3 Wasser-RSA-NaJ-Mischungen	28
4.3.4 Wasser-RSA-KSCN-Mischungen	29
5. Diskussion	34
5.1 pH-Messung und Wasserstoffionenbindung	35
5.2 Spezifische Anionenbindung	37

5.3 Molarer Volumeneffekt bei der Bindung von Anionen an RSA	41
5.4 Einfluß der Elektrostriktion bzw. hydro- phober Wechselwirkung der Anionen auf das spezifische Volumen	46
5.5 Effektiver molarer Volumeneffekt	58
5.5.1 Unsicherheiten bei der Bestimmung der effektiven Volumenänderung	64
6. Zusammenfassung	66
<u>Anhang</u>	68
A 1 Viskositätsmessungen	68
A 1.1 Prinzip der Messung	68
A 1.2 Ergebnisse	68
A 2 Meßprinzip des Densimeters	71
A 3 Berechnung der Standardabweichung von Ausgleichskurven	73
A 4 Rechenprogramme zur Datenanalyse	74
Zusammenstellung häufig verwendeter Symbole	75
<u>Tabellen</u> aller Meßergebnisse	78
Literaturverzeichnis	90

Vorbemerkung:

1. Alle Messungen wurden bei 25°C gemacht; infolgedessen beziehen sich die Angaben aller temperaturabhängigen Größen auch ohne ausdrückliche Erwähnung auf diese Temperatur.
2. Alle Fehlerangaben entsprechen der doppelten statistischen Sicherheit, also einem 95%igen Vertrauensbereich.

1. EINLEITUNG

1.1 Problemstellung

Ein Hauptanliegen biophysikalischer Untersuchungen ist die Kenntnis und das Verständnis der komplexen biochemischen und physiologischen Vorgänge, die in einer lebenden Zelle ablaufen. Das Zytoplasma der meisten tierischen und pflanzlichen Zellen enthält etwa 75 bis 85 Gewichtsprozent Wasser und etwa 15 bis 20 Gewichtsprozent Proteine. Der Rest verteilt sich auf verschiedene Arten der Nukleinsäuren und auf Lipide, die im wesentlichen in der zytoplasmatischen Membran und in den intrazellulären Membranen lokalisiert sind. Ein wichtiger Bestandteil des Zellinhaltes sind noch die Salzionen, wie z.B. Na^+ , K^+ , Cl^- , PO_4^{3-} usw., mit einer Konzentration von etwa 0,1 bis 0,3 Mol pro Kilogramm Zellwasser. Sie haben zusammen mit den Proteinen eine entscheidende Bedeutung für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Milieus. Es ist zu erwarten, daß die Proteine mit ihrer großen Oberfläche und ihren zahlreichen polaren Gruppen die Eigenschaften des Wassers und der anorganischen Elektrolyte beeinflussen. Das Verständnis der Struktur des Zytoplasmas setzt eine gewisse Kenntnis der Art und Größe der Wechselwirkung der Komponenten untereinander voraus.

1.2 Ziel der Arbeit

Da eine Zelle wegen der Vielzahl ihrer Komponenten einer exakten Beschreibung nicht zugänglich ist, werden in den meisten biophysikalischen Untersuchungen Modell-Lösungen zur Messung herangezogen. Als Zytoplasma-Modell werden in der vorliegenden Arbeit Lösungen von Rinder Serumalbumin (RSA) und verschiedenen Elektrolyten in Wasser verwendet. Serumalbumin, ein globuläres Protein mit den Maßen

144 x 45 x 22 Å (1), wird wegen seiner Eigenschaft, mit sehr vielen Substanzen reversible Bindungen einzugehen (vehicle-Funktion des Albumins im Blut) und vor allem wegen seiner starken Bindung von vielen Anionen bevorzugt zur Untersuchung von Protein-Ionen-Wechselwirkung herangezogen.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, welchen Beitrag zum Verständnis des thermodynamischen Zustandes des Zytoplasmas Dichtemessungen von Modell-Lösungen zu leisten vermögen. Ausgehend von einer binären Wasser-Protein-Mischung als einfachstes Modell wird der Einfluß der Anionen Chlorid, Jodid und Thiocyanat untersucht. Da die Änderungen des spezifischen Volumens im Promille-Bereich liegen, müssen die relativen Unsicherheiten der Meßwerte des spezifischen Volumens und der Massenanteile kleiner 10^{-4} sein.

Bei der binären H₂O-RSA-Mischung wird das spezifische Volumen bis zu einer Protein-Konzentration von 41% gemessen; bei ternären Gemischen beträgt die maximale Protein-Konzentration ca. 25%. Der Elektrolytanteil variiert - bei den einzelnen Salzen unterschiedlich - bis zu 1,3 Mol pro Kilogramm Wasser. Die Konzentrationsverhältnisse decken damit bei weitem den biologisch relevanten Bereich ab.

Zur Diskussion möglicher Wechselwirkungen werden in der Literatur vorhandene Werte bzgl. der Zahl gebundener Ionen und der molaren Volumen der Ionen herangezogen.

2. METHODIK

2.1 Herstellung der Proben

2.1.1 Rinderserumalbumin

Für alle Lösungen wurde entionisiertes und doppelt destilliertes Wasser bzw. Wasser aus einer Aufbereitungsanlage AQUABEST der Firma K. Klein, Mannheim, verwendet; die spezifische Leitfähigkeit des Wassers war $< 2 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Die RSA-Lösungen wurden aus dem Präparat "Serumalbumin vom Rind, trocken, reinst" von den Behring-Werken, Marburg, hergestellt. Da das Präparat noch Anteile von NaCl enthält (2), wurde eine Stammlösung von ca. 10% angesetzt und diese mehrmals über eine Mischbett-Ionenaustauscher-Säule entsalzt (Serdolit-MB, Serva, Heidelberg). Die Leitfähigkeit der so behandelten RSA-Lösung war $< 4 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Neben dem monomeren Protein mit einem Molekulargewicht von 69 000 (2) enthält das verwendete Präparat ca. 10% dimeres RSA und ca. 4% höhere Polymere (2). Bei allen Konzentrationsbestimmungen wurde das gesamte RSA als monomeres Protein angesehen.

Diese Stammlösung wurde gefriergetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei ca. 4°C gelagert. Konzentrierte Lösungen wurden durch Auflösen des pulverförmigen RSA in Wasser hergestellt, wobei zur Erreichung eines hohen Homogenitätsgrades die Mischung mehrere Stunden bzw. bei Lösungen mit einem RSA-Anteil von 30 - 40 % ca. 3 Tage bei 4°C auf einer Drehscheibe langsam bewegt wurde. Unmittelbar vor der Messung wurde die Lösung entgast und der sich bildende Schaum entfernt.

2.1.2 Salze

Die verwendeten Salze - KCl, KJ, NaJ, KSCN - mit dem Reinheitsgrad suprapur (Merck) wurden über 24 Stunden bei 110°C getrocknet. Die Massenanteile wurden durch Einwiegen auf einer Analysenwaage und einer elektrostatischen Waage (Cahn Gram Electrobalance) bestimmt und bezüglich Auftrieb korrigiert. Bei den Kaliumsalzen waren hygroskopische Effekte innerhalb der Wägezeiten nicht feststellbar; lediglich das NaJ mußte wegen hygroskopischer Massenzunahme in einer glove-box bei einer relativen Luftfeuchte < 8% eingewogen werden.

2.2 Messung des spezifischen Volumens

Das spezifische Volumen der Lösungen wurde mit einem Densimeter DMA 02 C der Firma Anton Paar, Graz, gemessen; bei diesem Meßverfahren wird die ungedämpfte Eigenschwingung eines Biegeschwingers, der mit der flüssigen Probe gefüllt ist, gemessen. Eine genaue Beschreibung dieses Meßprinzips ist bei (3,4,5) zu finden. Die Meßzelle - und damit auch die Proben - wurde mit zwei Thermostaten auf einer Temperatur von $25,00 \pm 0,01^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Temperatur wurde mit einem geeichten Hg-Thermometer und einem Hewlett-Packard Quartzthermometer 2801 A überwacht. Vor jeder Messung wurde das Densimeter mit Luft bekannter Dichte (6) und doppelt destilliertem und entgastem Wasser (Dichte bei 25°C $d = 0,997045 \text{ g cm}^{-3}$) (7) kalibriert.

2.3 Bestimmung der Massenanteile

Die große Genauigkeit der Dichtebestimmung verlangte, den Anteil der Trockenmasse in den Lösungen mit einer Genauigkeit von 0,1 % oder besser zu bestimmen. Das hier ange-

wandte Verfahren zur Bestimmung des Massenbruchs der Lösungen entspricht weitgehend dem von Bernhardt beschriebenen (8,9,10). Von jeder Probe wurde 1 cm^3 der Lösung in Al-Töpfchen gefüllt und mit der elektrostatischen Cahn-Waage gewogen, wobei die Verdunstungsverluste während des Wägevorganges korrigiert wurden. Das Wasser wurde durch Gefrier-trocknung und anschließendes Erhitzen im Vakuum entfernt: Neben dem freien Wasser der Lösung muß das am Protein physikalisch und chemisch adsorbiert vorliegende Wasser entfernt werden: das physisorbierte Wasser - verursacht durch van-der-Waals-Kräfte - desorbiert vollständig im Vakuum, während das an hydrophilen Gruppen chemisorbierte Wasser bei Erhitzen auf 110°C weitgehend freigesetzt wird (11,12, 13,14). Ein Erhitzen auf 110°C unter Atmosphärendruck ist nicht möglich, da das Protein dabei denaturiert wird (11). Eine Trockendauer von 6 - 10 Stunden, wie sie von Kretschmer (11) und Hunter (14) als ausreichend angesehen wird, ist ungenügend. Auch nach 100 Stunden konnte noch eine Massenabnahme festgestellt werden. Deshalb wurden die Proteine in zwei Zyklen von jeweils 100 Stunden bei 110°C und einem Druck von $2,7 \cdot 10^{-4}$ mbar (Öldiffusionspumpe) bzw. $1,3 \cdot 10^{-6}$ mbar (Turbomolekularpumpe) getrocknet.* Der Vakuumofen wurde mit flüssigem Stickstoff belüftet, um zu verhindern, daß beim Fluten Wasserdampf in die Anlage gelangt. Die getrockneten Proben wurden in einer glove-box bei einer relativen Luftfeuchte $< 8\%$ gewogen. Alle Wägungen sind bezüglich Auftrieb korrigiert.

*

Die Trocknungsanlage wurde im Verlauf der Messungen umgebaut.

2.4 Fehlerbetrachtung

2.4.1 Fehler bei der Dichtebestimmung

Die geforderte Genauigkeit der Dichtebestimmung verlangt bei diesem Meßverfahren eine Temperaturkonstanz des Biegeschwingers und der Probe von 10^{-2} K; dies ist durch die Thermostatisierung mit zwei hintereinandergeschalteten Thermostaten zu erreichen. Eine Temperaturänderung $\Delta T = \pm 0,01$ K ergibt aufgrund des geänderten Elastizitätsmoduls des Quarz-Schwingers eine Änderung der angezeigten Dichte $\Delta d = \pm 1,5 \cdot 10^{-6}$ g/cm³; dazu addiert sich die veränderte Dichte der Probe $\Delta d = \pm 2 \cdot 10^{-6}$ g/cm³ (4). Bei einer Temperaturänderung $\Delta T = \pm 0,01$ K resultiert also eine Unsicherheit der gemessenen Dichte $\Delta d = \pm 3,5 \cdot 10^{-6}$ g/cm³.

Es zeigte sich, daß die Biegeschwingermethode nur für Gase und Flüssigkeiten sehr geringer Viskosität Dichtebestimmungen dieser Genauigkeit erlaubt; für viskose Flüssigkeiten, wie sie hochkonzentrierte Proteinlösungen darstellen, ergibt sich ein systematischer Fehler (s. Anhang A 2). Dieser systematische Fehler kann nur für Viskositäten $\eta \leq 5$ mPa s vernachlässigt werden, d.h. für Proteinlösungen mit einem RSA-Anteil von weniger als 12 %. Bei der Zugabe von Elektrolyten zur Proteinlösung nimmt die Viskosität drastisch ab; z.B. besitzt eine 41%-ige H₂O-RSA-Lösung eine Viskosität $\eta = 35\,500$ mPa s, * während ein Massenanteil von nur 0,03% KCl in dieser Lösung die Viskosität auf 400 mPa s verringert (bei jeweils 25°C). Eine ausführliche Beschreibung der Viskositätsmessungen ist im Anhang A 1 zu finden. Für jede Probe mit mehr als 12% Proteinanteil wurde die Viskosität bestimmt (Haake Rotovisko RV 3 mit Meßkopf SV SP), so daß mit Hilfe der Korrekturfunktion (15) die densimetrischen Werte korrigiert werden konnten:

* Eine Flüssigkeit mit $\eta = 35\,500$ mPa s ist nur mehr sehr langsam fließfähig.

$$v_{\text{korr}} = v + \Delta v$$

mit:

$$\Delta v = 1 \cdot 10^{-3} \cdot v \quad \text{bei } \eta = 500 \text{ mPa s}$$

$$\Delta v = 0,5 \cdot 10^{-3} \cdot v \quad \eta = 100 \text{ mPa s}$$

$$\Delta v = 0,2 \cdot 10^{-3} \cdot v \quad \eta = 20 \text{ mPa s}$$

Diese drei Beispiele stehen nur zur Verdeutlichung der Größenordnung der Korrektur. Die jeweiligen Meßwerte wurden numerisch mit der in Abbildung 1 dargestellten Korrekturfunktion berichtigt. Die Unsicherheit bei der Bestimmung des spezifischen Volumens hochkonzentrierter Proteinlösungen bleibt im gesamten Bereich kleiner als $1 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{g}^{-1}$.

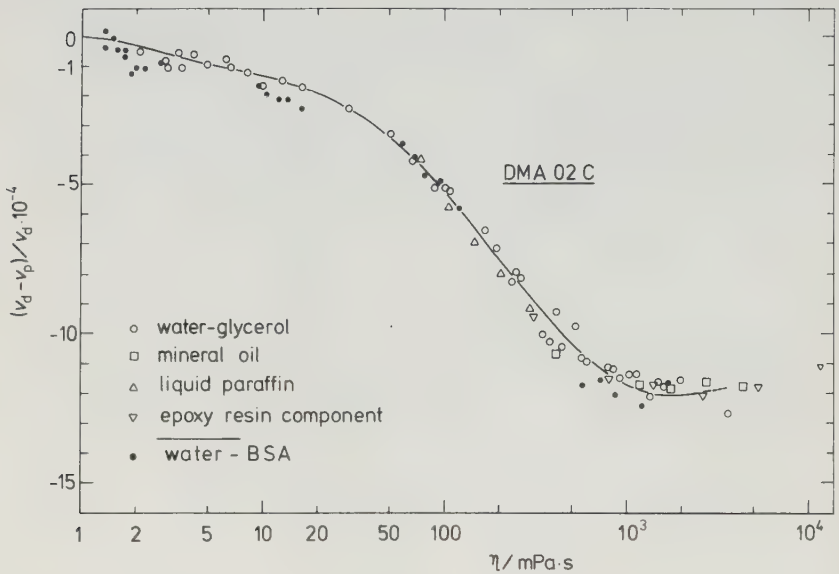


Abbildung 1 (entnommen aus (15)):

Systematische Abweichungen des Densimeters in
Abhängigkeit von der Viskosität der Probe.

v_d ... mit dem Densimeter gemessenes spez. Volumen

v_p ... mit dem Pyknometer gemessenes spez. Volumen

2.4.2 Fehler bei der Massebestimmung

Die Bestimmung der Probenmassen erfolgte mit einer Elektro-Cahn-Waage. Diese Waage besitzt eine Ablesegenauigkeit von 0,01 % vom Vollausschlag. Die Probenmassen betragen einige wenige Milligramm bis zu einigen hundert Milligramm. Durch vorherige Austarierung wurde die Waage immer im Bereich bis 100 mg betrieben; es ergab sich somit eine absolute Ablesegenauigkeit von $1 \cdot 10^{-5}$ g.

Unsicherheiten bei der Bestimmung der Trockenmasse treten auf durch Readsorption von H_2O -Molekülen beim Öffnen des Vakuumofens bzw. beim Wiegen der Proben und durch teilweise unvollständige Entfernung der H_2O -Moleküle (Proteine binden Wasser nicht nur an der Oberfläche, sondern auch innerhalb des Makromoleküls; dieses läßt sich ohne Zerstörung des Proteins nicht entfernen).

Die Standardabweichung bei der Bestimmung des Massenbruches $w_{\text{Trocken}} = m_{\text{Trocken}}/m_{\text{gesamt}}$ wurde bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 2 dargestellt.

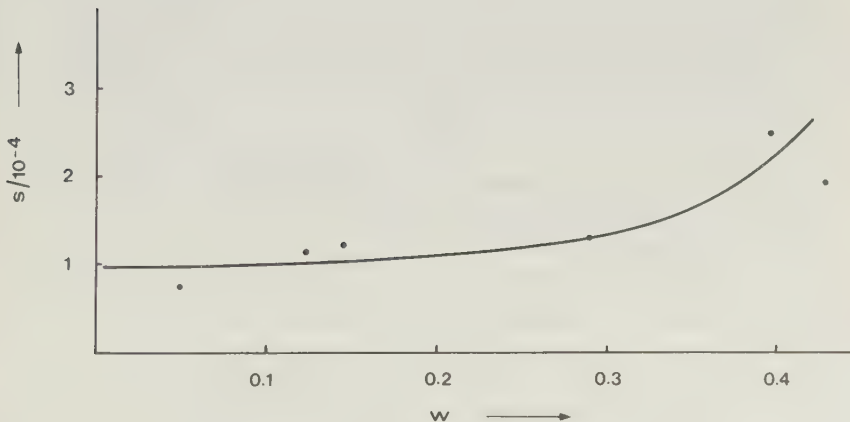


Abbildung 2: Standardabweichung bei der Bestimmung des Massengehalts der Trockenkomponente

3. MATHEMATISCHE BESCHREIBUNG DES SPEZIFISCHEN VOLUMENS TERNÄRER MISCHUNGEN

Es wurde das spezifische Volumen v der Gesamtmischung gemessen. Um Aussagen über eine mögliche Wechselwirkung - soweit sie in einer Änderung des spezifischen Volumens zum Ausdruck kommt - zwischen Protein und Ionen machen zu können, muß für die Entwicklung des spezifischen Volumens der ternären Mischung ein Ansatz gewählt werden, der die Additivität der Beiträge der einzelnen Komponenten zuläßt. In der vorliegenden Arbeit wird zur Beschreibung der Meßwerte ein Formalismus verwendet, der in Anlehnung an die Theorie von McMillan-Mayer (16) steht.

Die McMillan-Mayer-Theorie wird vorwiegend zur Beschreibung von Systemen verschiedenartiger Komponenten verwendet (z.B. Polymere in einem Lösungsmittel gelöst) * (17). Sie wurde u. a. von Stigter (18) zur Beschreibung des thermodynamischen Verhaltens von Sukrose- und Glukose-Lösungen aufgrund von van-der-Waals- und Wasserstoffbrücken-Bindungen benützt. Kozak (19) verwendete die Theorie zur Beschreibung von 2-Teilchen- und 3-Teilchen-Wechselwirkung in Lösungen von Nichtelektrolyten.

Um die Additivität der Komponenten im Ansatz zuzulassen, wird das spezifische Volumen der ternären Mischung nach dem scheinbaren spezifischen Volumen von Protein bzw. Salz in binärer Mischung entwickelt:

$$(1) \quad v = v_1^0 w_1 + \phi_2 w_2 + \phi_3 w_3 + 2 v_{23} b_3 w_2 + \dots$$

wobei v_1^0 das spez. Volumen von reinem Wasser ist,

ϕ_2, ϕ_3 das scheinbare spez. Volumen von Protein bzw. Salz,

w_i ($i=1,2,3$) der Massenbruch der Komponente 1,2,3 und

b_i ($i=2,3$) die Molalität der Komponente 2,3;

* Zur Beschreibung gleichartiger Systeme (z.B. eine Mischung Alkohol-Wasser) wird die formal äquivalente Kirkwood-Buff-Theorie verwendet.

der Term $2 v_{23} b_3 w_2$ wird zur Beschreibung der Abweichung von der Additivität, d.h., zur Beschreibung der Wechselwirkung zwischen den Komponenten 2 und 3 verwendet. Wie später gezeigt wird, genügt dieser Term zur Beschreibung; weitere Koeffizienten sind nicht signifikant.

Zur Entwicklung der scheinbaren spezifischen Volumen wird, wie in der Literatur üblich (20,21,22,23,24) ein Ansatz nach den Molalitäten gewählt:

$$(2) \quad \phi_2 = v_2^\infty + A_2 b_2^{1/2} + B_2 b_2$$

$$(3) \quad \phi_3 = v_3^\infty + A_3 b_3^{1/2} + B_3 b_3$$

wobei v_2^∞, v_3^∞ das partielle spezifische Volumen der Komponente 2 bzw. 3 in unendlicher Verdünnung ist. Für die binäre Protein-Wasser-Mischung ergibt das Experiment $A_2 = B_2 = 0$ (s. Abschnitt 4.1).

Für Salzlösungen wird bei Berücksichtigung des Debye-Hückel'schen Grenzgesetzes - wie von Masson (25) gezeigt - ein Term proportional zu $b_3^{1/2}$ benötigt (s. Abschnitt 4.2). Dieses Grenzgesetz gilt jedoch streng nur für verdünnte Lösungen. Da für die untersuchten Konzentrationen diese Bedingung nicht immer erfüllt ist, wird ein weiterer Term proportional zu b_3 zur Beschreibung des scheinbaren spez. Volumens verwendet (20,21,23).

Nach Einführen des Massenverhältnisses $\zeta_i = m_i/m_1$ folgt aus der Gleichung (1) mit den Gleichungen (2) und (3):

$$(4) \quad \frac{v}{w_1} = v_1^0 + v_2^\infty \zeta_2 + v_3^\infty \zeta_3 + A_3 b_3^{1/2} \zeta_3 + B_3 b_3 \zeta_3 + 2 v_{23} b_3 \zeta_2$$

Eine Umbenennung der Koeffizienten ergibt:

$$(5) \quad v/w_1 = \beta_{00} + \beta_{10} \zeta_2 + \beta_{01} \zeta_3 + \beta_{0 \ 3/2} \zeta_3^{3/2} + \beta_{02} \zeta_3^2 + \\ + \beta_{11} \zeta_2 \zeta_3$$

wobei:

$$\begin{aligned} \beta_{00} &= v_1^0 \\ \beta_{10} &= v_2^\infty \\ \beta_{01} &= v_3^\infty \\ \beta_{0 \ 3/2} &= A_3 \frac{1}{\sqrt{M_3}} \\ \beta_{02} &= B_3 \frac{1}{M_3} \\ \beta_{11} &= 2 \ v_{23} \frac{1}{M_3} \end{aligned}$$

Gleichung (5) ist die Entwicklung der Größe $v/w_1 = V/m_1$ nach den Massenverhältnissen $\zeta_i = m_i/m_1$, also eine Entwicklung nach voneinander unabhängigen Größen.

Die Koeffizienten β_{10} , β_{01} , $\beta_{0 \ 3/2}$ und β_{02} werden aus den Messungen binärer Wasser-RSA- bzw. Wasser-Salz-Mischungen erhalten:

$$(6) \quad v/w_1 = \beta_{00} + \beta_{10} \zeta_2 \quad (\text{Wasser-RSA})$$

$$(7) \quad v/w_1 = \beta_{00} + \beta_{01} \zeta_3 + \beta_{0 \ 3/2} \zeta_3^{3/2} + \beta_{02} \zeta_3^2 \quad (\text{Wasser-Salz})$$

Um den Wechselwirkungskoeffizienten β_{11} der Komponenten 2 und 3 (d.h. RSA und Salz) in ternären Gemischen zu erhalten, wird für jeden Meßpunkt v der folgende Ausdruck berechnet:

$$\begin{aligned}
 (8) \quad \Delta(v/w_1)(\zeta_2, \zeta_3) &:= v/w_1 - v_1^O - \phi_2 \zeta_2 - \phi_3 \zeta_3 = \\
 &= v/w_1 - \beta_{00} - \beta_{10} \zeta_2 - \beta_{01} \zeta_3 - \beta_{0 \ 3/2} \zeta_3^{3/2} - \beta_{02} \zeta_3^2 = \\
 &= \beta_{11} \zeta_2 \zeta_3
 \end{aligned}$$

In Gleichung (8) wird für den Koeffizienten β_{00} der Literaturwert (7) des spezifischen Volumens des reinen Wassers $v_1^O = 1,002964 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ eingesetzt. Für jedes Ensemble von Meßpunkten kann aus den Wertepaaren $(\Delta(v/w_1), \zeta_2 \zeta_3)$ der Koeffizient β_{11} - im Fall eines linearen Zusammenhangs - berechnet werden; sollte ein Term höherer Ordnung signifikant sein, so würde dies beim Fitverfahren erkannt werden.

4. MESSUNGEN

4.1 Wasser-RSA

Für 94 Proben mit verschiedenem Massenanteil von RSA ist das spezifische Volumen bestimmt worden; es sind hierfür im Verlauf eines Jahres vier voneinander unabhängige Meßreihen gemacht worden. Alle Mischungen mit einem größeren Proteinanteil als 12% (d.h. $w_2 > 0,12$ bzw. $\zeta_2 > 0,14$) sind bzgl. des viskositätsabhängigen systematischen Densimeterfehlers korrigiert (s. Abschnitt 2.4.1). Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abbildung 3 dargestellt: Der Quotient v/w_1 ist in Abhängigkeit von dem Massenverhältnis ζ_2 aufgetragen.

Die Wertepaare $(v/w_1, \zeta_2)$ wurden nach der Methode der kleinsten Quadrate angepaßt; es ergibt sich ein linearer Zusammenhang mit den Koeffizienten

$$\beta_{00} = 1,002973 \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$$

$$\beta_{10} = 0,733962 \pm 7,9 \cdot 10^{-5};$$

die Unsicherheiten der Koeffizienten entsprechen einem Vertrauensbereich von 95%.

Um die Streuung der Meßwerte besser sichtbar zu machen, wird folgende Differenzfunktion berechnet:

$$\Delta(V/m_1) = \Delta(v/w_1) = v/w_1 - \beta_{00} - \beta_{10} \zeta_2$$

und diese über ζ_2 aufgetragen (s. Abbildung 4).

Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen der Standard-

abweichung der Regressionsgeraden bei 5% Irrtumswahrscheinlichkeit; sie wurden aus der Varianz und Kovarianz der Koeffizienten errechnet (s. Anhang A 3).

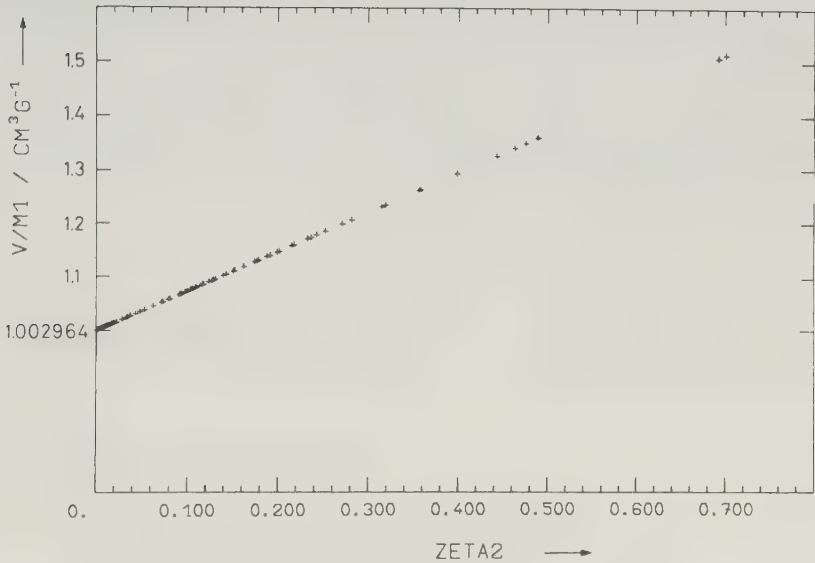


Abbildung 3: Volumen pro Gramm Wasser der RSA-Lösung in Abhängigkeit von dem Massenverhältnis $\zeta_2 = m_2/m_1$ bei 25,00°C.

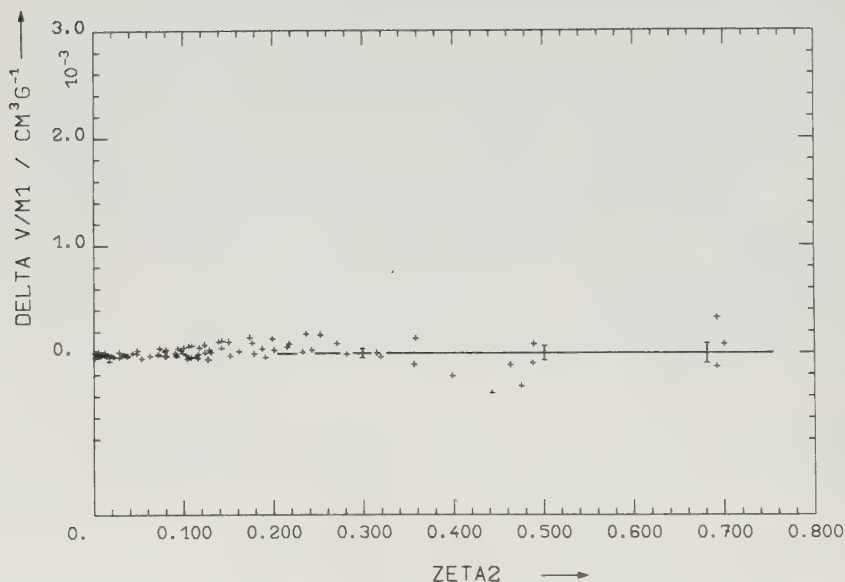


Abbildung 4: Streuung der Meßwerte um die Ausgleichsgerade für die H_2O -RSA-Mischung. Die Fehlerbalken entsprechen einem 95%igen Vertrauensbereich der Ausgleichsgerade

In der folgenden Tabelle sind Literaturwerte des partiellen spezifischen Volumens von Rinderserumalbumin und der in dieser Arbeit gemessene Wert zusammengefaßt.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Literaturwerte des partiellen spezifischen Volumens von RSA bei 25°C

Autor	part. spez. Volumen $v_2^\infty / \text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$
H.B. Bull (26)	0,7376
M.J. Hunter (14)	0,7348
M.O. Dayhoff (27)	0,7343
K. Gekko (28)	$0,735 \pm 1 \cdot 10^{-3}$
J. Bernhardt (15)	$0,73388 \pm 3,2 \cdot 10^{-4}$ (Densimeter) $0,73395 \pm 4,6 \cdot 10^{-4}$ (Pyknometer)
diese Arbeit	$0,733962 \pm 7,9 \cdot 10^{-5}$

4.2 Wasser-Salz-Mischungen

Es wurde das spezifische Volumen v von Elektrolytlösungen gemessen und in Abhängigkeit von der Konzentration, d.h. des Massenverhältnisses $\zeta_3 = m_3/m_1$, nach der Methode der kleinsten Quadrate angepaßt:

$$v/w_1 = \beta_{00} + \beta_{01} \zeta_3 + \beta_{0 \ 3/2} \zeta_3^{3/2} + \beta_{02} \zeta_3^2$$

Entsprechend den Voraussagen der Debye-Hückel-Theorie (23,29) genügt zur Beschreibung thermodynamischer Größen von verdünnten Lösungen starker Elektrolyten ein Term

proportional $\sqrt{c}$ (wobei c die molare Konzentration der Lösung ist), bzw. in obiger Darstellung ein Term proportional $\zeta_3^{3/2}$. Diese Bedingung gilt jedoch streng nur für Molalitäten kleiner als 0,2 mol/kg (30,31,32). Da bei den hier untersuchten Salzlösungen die Molalitäten größer als 1 mol/kg sind, wird zur Beschreibung ein Term höherer Ordnung hinzugenommen (21,22,23).

Um zu testen, ob der zusätzliche quadratische Term eine signifikante Verbesserung der Anpassung bringt, wurde ein F-Test ausgeführt. Zum Vergleich der Potenzreihen P_0 ($\beta_{00}, \beta_{01}, \beta_{0\ 3/2}$) und P_1 ($\beta_{00}, \beta_{01}, \beta_{0\ 3/2}, \beta_{02}$) wird der Wert $F_x = v_1 (M_0 - M_1) / M_1$ berechnet, wobei v_1 die Anzahl der Freiheitsgrade und M_0 bzw. M_1 die durch die Varianz dividierte Summe der Abweichungsqadrate sind. Dieser Wert wird mit den tabellierten Werten einer F-Verteilung mit $v_0 = 1$ und v_1 verglichen. Es zeigt sich, daß der zusätzliche Term keine signifikante Verbesserung bringt. Nur die Überlegung, daß die Voraussetzungen des Debye-Hückel'schen Grenzesetzes nicht mehr gewährleistet sind, und die Tatsache, daß sich bei ausschließlicher Verwendung eines $\zeta_{0\ 3/2}$ -Terms für die partiellen spezifischen Volumen in unendlicher Verdünnung, v_3^∞ , Abweichungen von den Literaturdaten ergeben, rechtfertigen die Verwendung des zusätzlichen Terms. Dies trifft jedoch nicht zu für die Kaliumthiocyanatlösung, da die maximale Konzentration dieser Lösung nur 0,7 mol/kg beträgt. Die v/w_1 (ζ_3)-Abhängigkeit wird hinreichend genau durch einen $\zeta_{0\ 3/2}$ -Term oder einen quadratischen Term beschrieben, beide Terme zusammen bedeuten keine Verbesserung. Zur weiteren Auswertung wird im folgenden die quadratische Funktion verwendet.

In Tabelle 2 stehen die berechneten Koeffizienten, die Anzahl der Meßpunkte N , das reduzierte χ^2 , sowie die maximale Molalität b . Die partiellen spezifischen Volumen in unendlicher Verdünnung $v_3^\infty \equiv \beta_{01}$ sind im Rahmen der Fehlergrenzen (95% Vertrauensbereich) in Übereinstimmung

mit den Literaturwerten:

Millero und Vaslow (22,30) geben als partielles spezifisches Volumen von KCl $0,3601 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ an; der entsprechende Wert für KJ lautet bei Millero (22) $0,2725 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ und bei Friedman (33) $0,2722 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$; bei NaJ geben Millero und Friedman (22,33) $0,2335 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ an. Für KSCN standen keine Literaturdaten zur Verfügung.

Um die geringe Nichtlinearität des spezifischen Volumens und die Streuung der Meßpunkte besser sichtbar zu machen, wird - wie im Fall der H_2O -RSA-Mischung - die Differenzfunktion

$$\Delta(V/m_1) = \Delta(v/w_1) = v/w_1 - \beta_{00} - \beta_{01} \tau_3$$

berechnet und über dem Massenverhältnis τ_3 aufgetragen (Abbildungen 5 a) - d)).

Zum Vergleich ist in Abbildung 6 der vollständige $v/w_1 (\tau_3)$ -Verlauf im Fall der KJ-Lösung dargestellt.

Aus den Verdunstungsverlusten während der Messung und der Ablesegenauigkeit der Waage wird eine Standardabweichung der Meßpunkte von $2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ bestimmt.

Tabelle 2: Zusammenstellung der Koeffizienten der Potenzreihen

	$\frac{\beta_{00}}{3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	$\frac{\beta_{01}}{3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	$\frac{\beta_{0 \ 3/2}}{3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	$\frac{\beta_{02}}{3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	N	x_v^2	$b_{\text{max}}/\text{mol kg}^{-1}$
KCl	1,002957 11	0,3620 28	0,078 21	0,041 40	75	1,0	1,6
KJ	1,002973 32	0,2724 34	0,018 15	0,010 19	15	0,7	1,4
NaJ	1,002962 40	0,2345 56	0,015 30	0,027 44	14	0,9	1,1
KSCN	1,002960 22	0,5173 19	--	0,116 27	14	1,4	0,7
KSCN	1,002973 26	0,5116 34	0,051 12	--	14	1,7	0,7
KSCN	1,002945 40	0,523 12	-- 0,05 10	0,22 22	14	1,5	0,7

Die Ziffern unter den Koeffizienten geben die Unsicherheit entsprechend einem 95%igen Vertrauensbereich an.

Abbildung 5: Messungen des spezifischen Volumens der Wasser-Salz-Mischungen bei 25,00°C. Dargestellt ist die Abweichung des Volumens pro Gramm Wasser vom linearen Teil der Ausgleichsfunktion in Abhängigkeit von dem Massenverhältnis $\zeta_3 = m_3/m_1$:

$$\Delta(v/w_1) = v/w_1 - \beta_{00} - \beta_{01} \zeta_3$$

Die Standardabweichungen der Ausgleichskurven (Restfehler) sind in der Größenordnung der Symbole der Meßpunkte; auf das Einzeichnen von Fehlerbalken kann deshalb verzichtet werden.

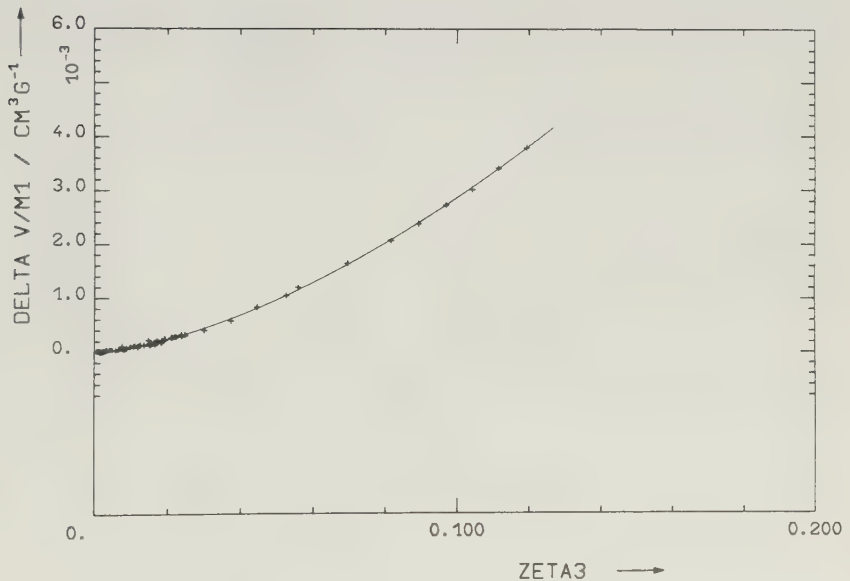


Abbildung 5 a): $\text{H}_2\text{O} - \text{KCl}$

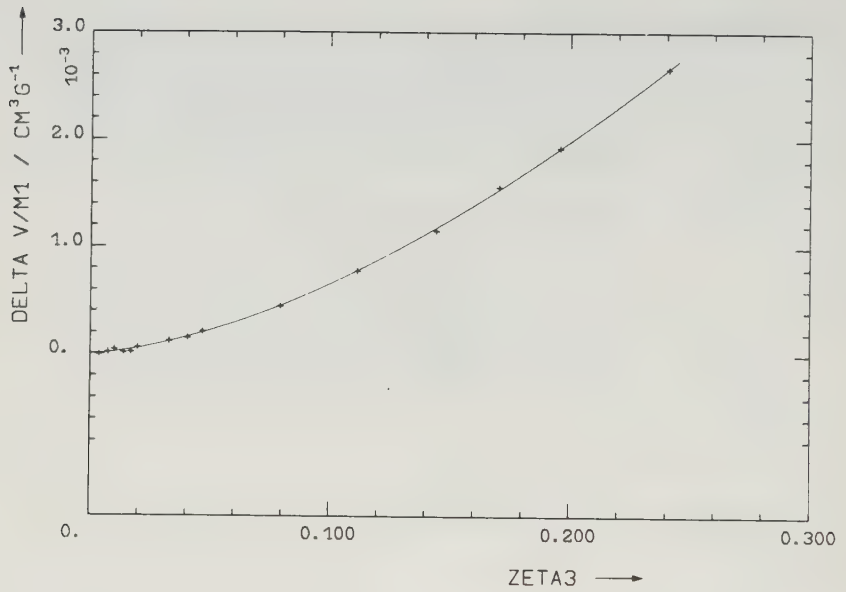


Abbildung 5 b): $\text{H}_2\text{O} - \text{KJ}$

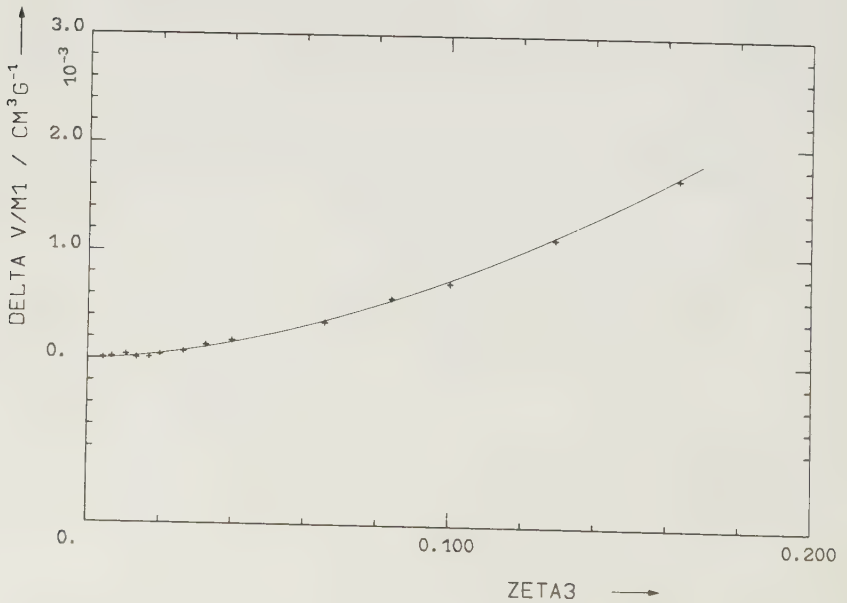


Abbildung 5 c): $\text{H}_2\text{O} - \text{NaJ}$

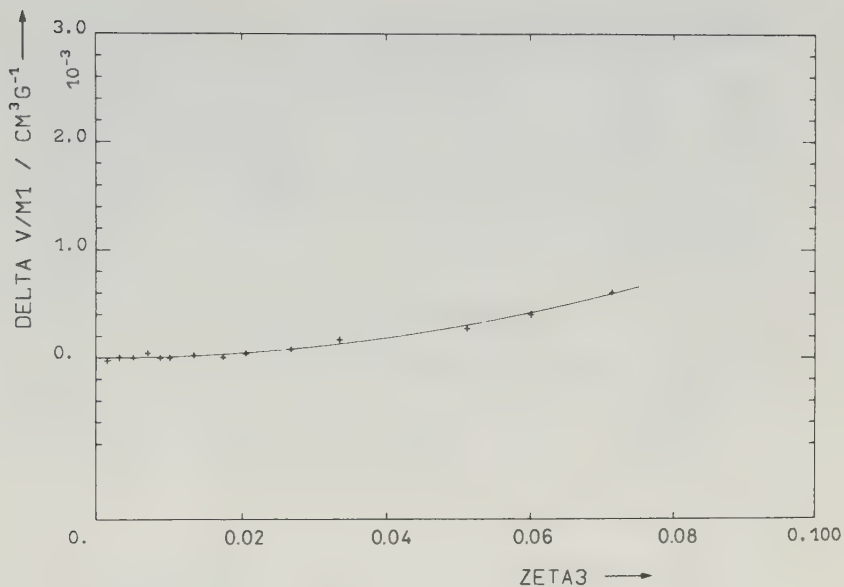


Abbildung 5 d): $\text{H}_2\text{O} - \text{KSCN}$

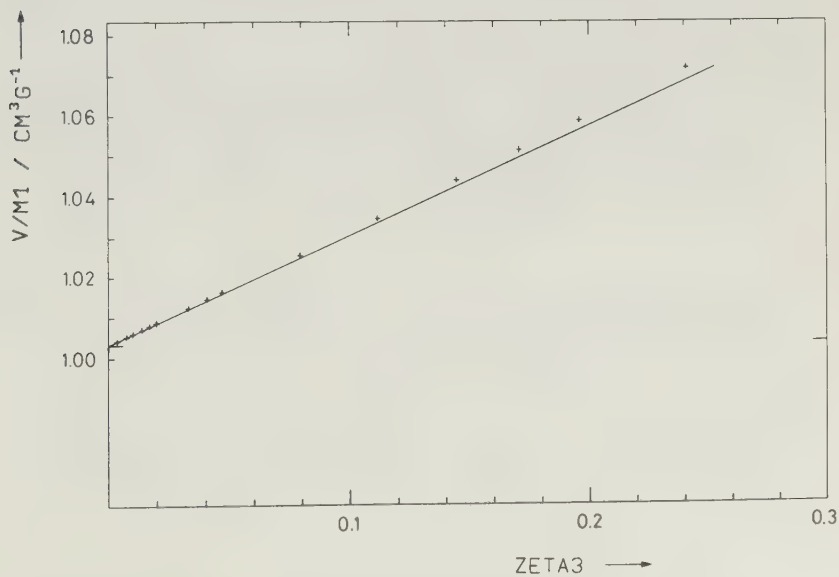


Abbildung 6: Volumen pro Gramm Wasser der KJ-Lösung in Abhängigkeit von dem Massenverhältnis. Eingezeichnet ist die Gerade mit der Steigung

4.3 Wasser-RSA-Salz-Mischungen

Obwohl aufgrund der Entwicklung des Quotienten v/w_1 nach den Massenverhältnissen ζ_i ($i = 2,3$) die Einhaltung der Bedingungen einer pseudobinären Mischung nicht erforderlich ist, wurde wegen der einfacheren Massenbestimmung (Bestimmung der Trockenkomponente 2 und 3 mit der Masse $m_2 + m_3$) in den meisten Fällen das Verhältnis

$$\alpha_3 = \frac{m_3}{m_2 + m_3} \quad \text{konstant gehalten. Bei Wasser-RSA-KCl-}$$

Mischungen wurden auch Meßreihen mit konstantem Wasser-RSA-Verhältnis

$$(\alpha_2 = \frac{m_2}{m_1 + m_2} = \text{const.}) \quad \text{und konstantem Wasser-Salz-Verhältnis}$$

$$(\alpha_1 = \frac{m_1}{m_1 + m_3} = \text{const.}) \quad \text{untersucht.}$$

Die Ergebnisse dieser Messungen werden in Abschnitt 4.3.1 bis 4.3.4 besprochen und sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

4.3.1 Wasser-RSA-KCl-Mischungen

Das spezifische Volumen von Wasser-RSA-KCl-Mischungen ist für insgesamt 76 Proben bestimmt worden. Ebenso wie bei den binären Wasser-RSA- und Wasser-Salz-Mischungen wurden auch bei den ternären Lösungen alle Proben vor der Messung entgast.

Bei einer der Meßreihen wurde das Wasser-RSA-Verhältnis konstant gehalten ($\alpha_2 = 0,25$) und KCl bis zu einer Molalität $b = 1,36$ mol/kg eingewogen. Nach Berechnung der Differenzfunktion $\Delta(v/w_1)$ (s. Gleichung 8) jedes Meßpunktes wurden die Werte nach der Methode der kleinsten Quadrate angepaßt: es ergibt sich eine lineare Funktion mit einer Steigung $\beta_{11} = 0,0280 \pm 3,8 \cdot 10^{-3}$. Eine zweite Meßreihe mit konstantem

RSA-KCl-Verhältnis ($\alpha_3 = 0,29$), einer maximalen RSA-Konzentration $\alpha_{2 \text{ max}} = 0,20$ und einer maximalen KCl-Molalität $b_{\text{max}} = 1,35 \text{ mol/kg}$ ergibt eine Steigung $\beta_{11} = 0,0289 \pm 5,0 \cdot 10^{-3}$. Beide Messungen sind in Abbildung 7 a) dargestellt. Zusätzlich sind Meßwerte eingetragen (●), die bei einer sehr hohen RSA-Konzentration von $\alpha_2 = 0,41$ bzw. $\alpha_2 = 0,38$ und einer KCl-Molalität $b = 0,61 \text{ mol/kg}$ bzw. $b = 0,53 \text{ mol/kg}$ gemessen wurden; diese Werte sind jedoch nicht für die Ausgleichsfunktion verwendet, da sie aufgrund der großen Massenanteile mit einem größeren Fehler behaftet sind und für den Geradenausgleich schwächer gewichtet sein müßten. Desweiteren wurde das spezifische Volumen einer Mischung mit 34 Gew. % RSA ($\alpha_2 = 0,34$) und einer KCl-Molalität $b = 2,16 \text{ mol/kg}$ gemessen; bei dem daraus resultierenden Abszissenwert $\zeta_2 \zeta_3 = 0,0828$ ergibt der Meßwert $\Delta (v/w_1)$ eine Steigung $\beta_{11} = 0,0293$.

Der Bereich sehr kleiner Konzentrationen ($\zeta_2 \zeta_3 < 0,004$) wurde gesondert untersucht, wobei unterschiedliche Nebenbedingungen, d.h. $\alpha_i = \text{const.}$, eingehalten wurden (s. Tabelle 3). Auch bei diesen kleinen Konzentrationen - maximal 12 Gew. % RSA und 0,40 mol KCl/kg Wasser - kann im Rahmen der Meßgenauigkeit nur ein linearer Wechselwirkungs-Parameter $\beta_{11} = 0,029 \pm 2,0 \cdot 10^{-2}$ festgestellt werden.

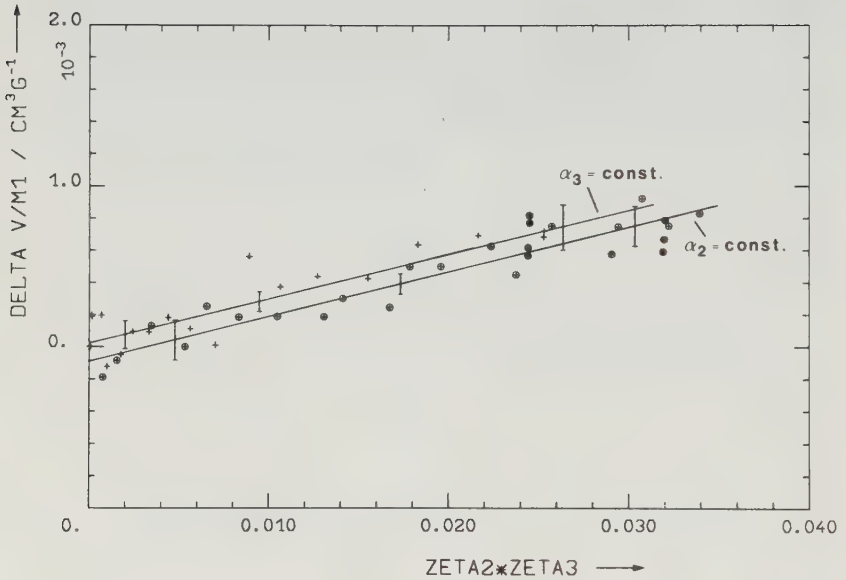


Abbildung 7 a): Zusätzlicher Volumenbeitrag $\Delta(v/w_1) = \beta_{11} \zeta_2 \zeta_3$
nach Gleichung (8) für H_2O -RSA-KCl-
Mischungen bei $25,00^\circ\text{C}$ im Bereich
 $0 < \zeta_2 \zeta_3 < 0,035$.

- + Randbedingung $\alpha_3 = \text{const.} = 0,29$
- ⊕ Randbedingung $\alpha_2 = \text{const.} = 0,25$
- $\alpha_2 = 0,41$ und $b = 0,61 \text{ mol kg}^{-1}$
- $\alpha_2 = 0,38$ und $b = 0,53 \text{ mol kg}^{-1}$

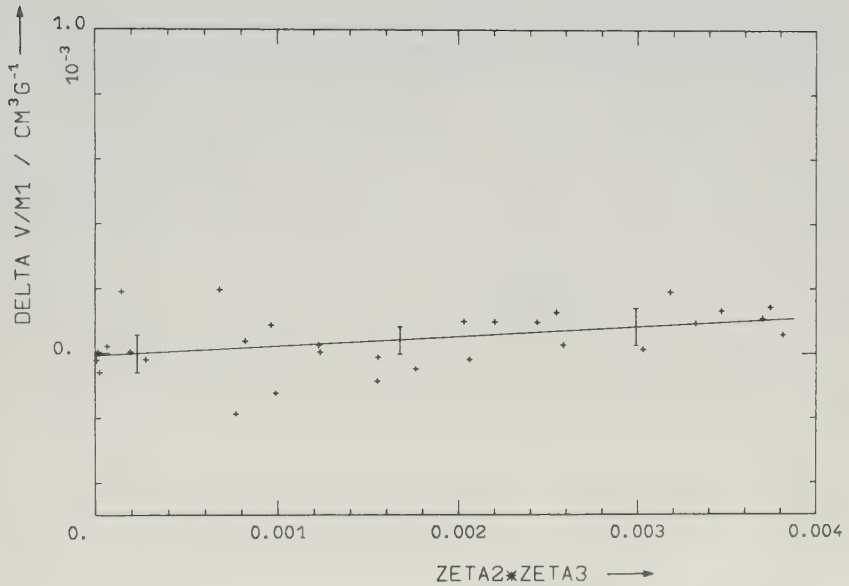


Abbildung 7 b): Zusätzlicher Volumenbeitrag $\Delta(v/w_1) = \beta_{11} \zeta_2 \zeta_3$ nach Gleichung (8) für H_2O -RSA-KCl-Mischungen bei $25,00^\circ C$ im Bereich $0 < \zeta_2 \zeta_3 < 0,004$

4.3.2 Wasser-RSA-KJ-Mischungen

Bei entsprechenden Messungen mit H_2O -RSA-KJ-Mischungen mit konstantem Protein/Salz-Verhältnis ($\alpha_3 = 0,19$), einer maximalen RSA-Konzentration $\alpha_{2 \max} = 0,25$ und einem $b_{\max} = 0,45 \text{ mol kg}^{-1}$ ergibt sich ein Wechselwirkungs-Parameter $\beta_{11} = 0,0180 \pm 5,6 \cdot 10^{-3}$.

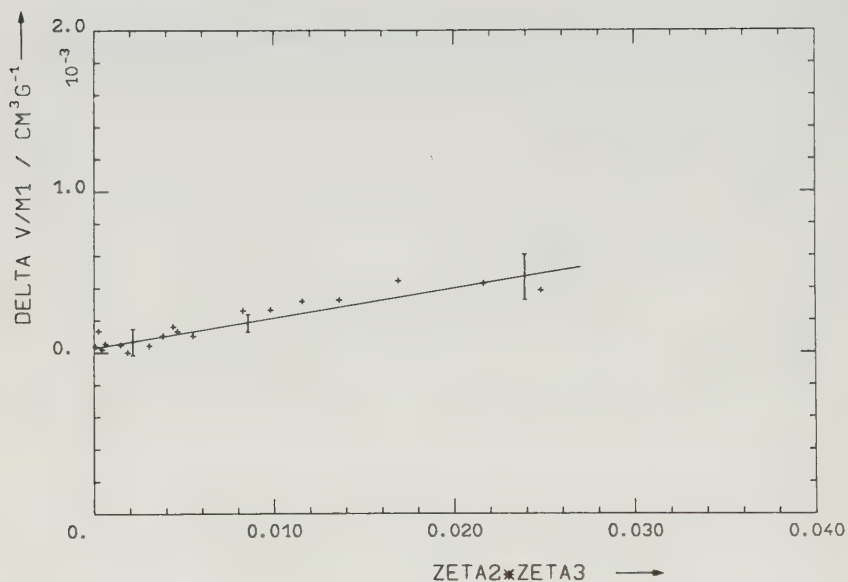


Abbildung 8: Zusätzlicher Volumenbeitrag $\Delta(v/w_1) = \beta_{11} \zeta_2 \zeta_3$ nach Gleichung (8) für H₂O-RSA-KJ-Mischungen bei 25,00°C

4.3.3 Wasser-RSA-NaJ-Mischungen

Bei Messungen mit NaJ wurde wegen dessen hygroskopischer Eigenschaft das Salz in der mit trockenem Stickstoff gefluteten glove-box eingewogen. Die Meßreihe mit ternären Mischungen hat eine maximale Salzmolalität $b_{\max} = 0,46 \text{ mol kg}^{-1}$ und eine maximale RSA-Konzentration $\alpha_{2 \max} = 0,26$. Die Steigung der Ausgleichsgeraden ergibt sich hier zu $\beta_{11} = 0,0206 \pm 4,4 \cdot 10^{-3}$.

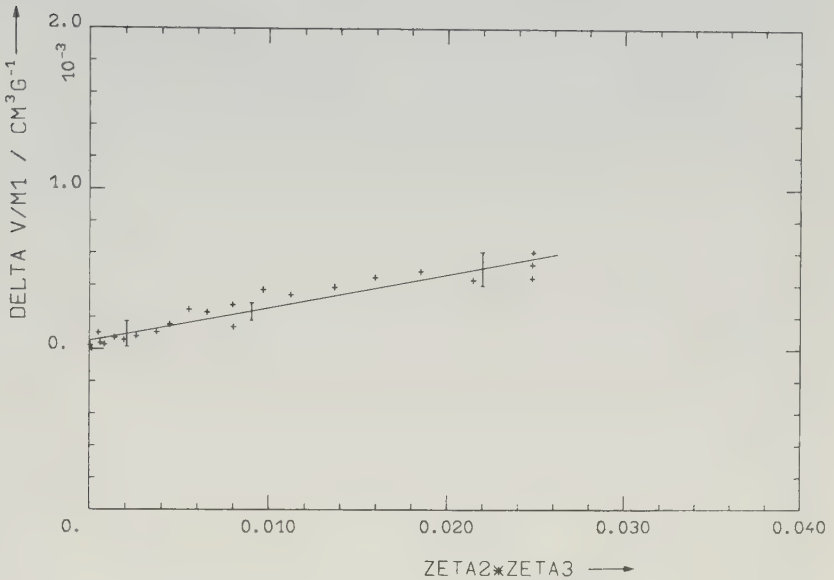


Abbildung 9: Zusätzlicher Volumenbeitrag $\Delta(v/w_1) = B_{11}\zeta_2\zeta_3$
nach Gleichung (8) für H_2O -RSA-NaJ-Mischungen
bei $25,00^\circ\text{C}$

4.3.4 Wasser-RSA-KSCN-Mischungen

Für die ternären Gemische mit Kaliumthiocyanat gilt ein konstantes $\alpha_3 = 0,20$, eine maximale RSA-Konzentration $\alpha_2 \text{ max} = 0,24$, sowie eine maximale Salzmolalität $b_{\text{max}} = 0,84 \text{ mol/kg}$. Wie in Abschnitt 5.2 gezeigt wird, besitzt das Thiocyanation eine größere Bindungsaffinität als Cl^- und J^- . Aus diesem Grund sind bei den vorliegenden Konzentrationsverhältnissen bei einem Abszissenwert $\zeta_2\zeta_3$ 0,01

bereits alle Bindungsstellen abgesättigt.

Unter der Voraussetzung, daß ein zusätzlicher Volumenbeitrag (nach Gleichung (8)) der ternären Mischung mit der Anionenbindung korreliert ist, ist ein Wechselwirkungsparameter β_{11} auch nur bis zu diesem Zustand sinnvoll:

für $\zeta_2 \zeta_3 \leq 0,0103$ ergibt sich ein Koeffizient $\beta_{11} = 0,027 \pm 1,2 \cdot 10^{-2}$.

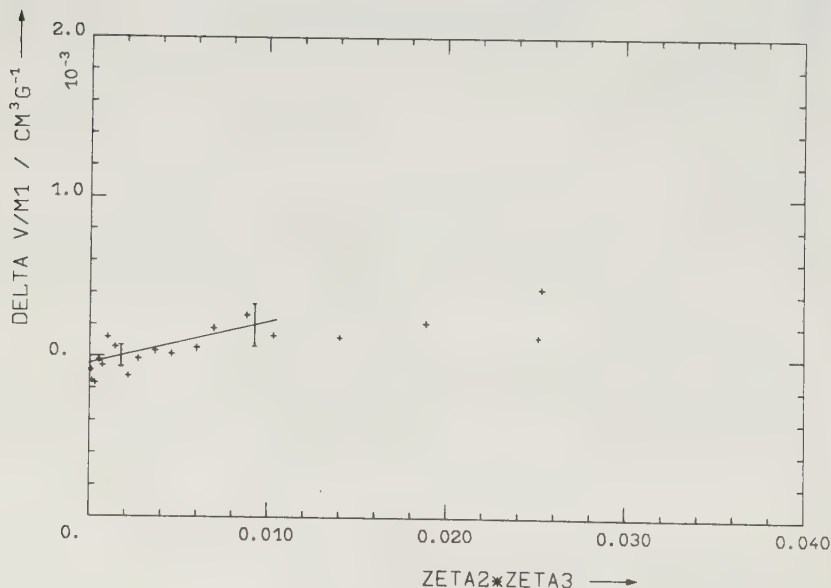


Abbildung 10: Zusätzlicher Volumenbeitrag $\Delta(v/w_1) = \beta_{11} \zeta_2 \zeta_3$
nach Gleichung (8) für H_2O -RSA-KSCN-
Mischungen bei $25,00^\circ\text{C}$

Im Gegensatz zur Cl^- - und J^- -Bindung wird bei der Bindung von SCN^- für $\zeta_2\zeta_3 < 0,0005$ eine kleine Kontraktion beobachtet, deren genauer Zahlenwert jedoch wegen des linearen Ausgleichs und der Streuung der Meßpunkte nicht angegeben werden kann; eine Extrapolation nach $\zeta_2\zeta_3 = 0$ ergibt $\Delta(v/w_1) = -4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Von Katz (34) wird bei $\zeta_2\zeta_3 \approx 10^{-4}$ eine Kontraktion von $6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3/\text{g}$ genannt.

Tabelle 3: Zusammenstellung der Messungen ternärer Mischungen. Angegeben sind die Randbedingung konstant gehaltener Massenbrüche α_i , die maximal vorkommende Proteinkonzentration α_2 und Salzmolalität b , die berechnete Steigung β_{11} sowie die Anzahl der Messpunkte N

	$\alpha_i = \text{const}$ $i = 1, 2, 3$	$\alpha_2 \text{ max}$	$b_{\text{max}}/\text{mol/kg}$	β_{11}	N
$\text{H}_2\text{O-RSA-KCl}$	$\alpha_2 = 0,25$	0,25	1,36	0,0280 38	20
	$\alpha_3 = 0,29$	0,20	1,35	0,0289 50	18
	$\alpha_1 = 0,97$	}			
	$\alpha_2 = 0,25$				
	$\alpha_3 = 0,16$				
	$\alpha_3 = 0,29$				
	$\alpha_3 = 0,06$	0,41	0,61	--	7
	$\alpha_3 = 0,24$	0,33	2,16	0,029	1
$\text{H}_2\text{O-RSA-KJ}$	$\alpha_3 = 0,19$	0,25	0,45	0,0180 56	18
$\text{H}_2\text{O-RSA-NaJ}$	$\alpha_3 = 0,16$	0,26	0,46	0,0206 44	23
$\text{H}_2\text{O-RSA-KSCN}$	$\alpha_3 = 0,20$	0,24	0,83	0,027 12	18 (22)

Zusammenfassung der Meßergebnisse:

Für die ternären Systeme Wasser-Rinderserumalbumin mit den Elektrolyten KCl, KJ, NaJ, KSCN wurde ein Wechselwirkungs-Parameter β_{11} bestimmt. Als Voraussetzung hierzu wurden die spezifischen Volumen der binären Mischungen H_2O -RSA und H_2O -KCL, H_2O -KJ, H_2O -NaJ, H_2O -KSCN gemessen. Zur Beschreibung der Volumenzunahme pro Gramm Wasser bei der Wechselwirkung zwischen Protein und Salz ist nur der eine Term $\beta_{11} \zeta_2 \zeta_3$ signifikant. Der Koeffizient β_{11} unterscheidet sich nur geringfügig bei Verwendung der verschiedenen Salze. Die beobachtete Expansion ist in allen Fällen $< 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Die Messung der binären H_2O -RSA-Mischung ergibt, daß das partielle spezifische Volumen des Rinderserumalbumin unabhängig von der Konzentration ist.

5. DISKUSSION

Wie im vorigen Kapitel gezeigt, wird in ternären Gemischen ein zusätzlicher Volumenbeitrag zu den addierten Beiträgen der entsprechenden binären Gemische beobachtet; dieser Volumenterm ist direkt proportional dem Produkt der Massenverhältnisse τ_i ($i = 1, 2$).

Im folgenden sollen Möglichkeiten diskutiert werden, die eine Volumenzunahme verursachen können; dazu werden teilweise in der Literatur vorhandene Ergebnisse bezüglich der Bindungen von Serumalbumin mit Ionen herangezogen.

In Abschnitt 5.1 wird die Möglichkeit untersucht, inwieweit Neutralisationsreaktionen, d.h. die Bindung von H^+ , eine Volumenänderung erzeugen können. In Abschnitt 5.3 werden die gemessenen spezifischen Volumen umgerechnet auf molare Volumenänderungen, d.h. auf Volumenzunahme pro Mol gebundener Ionen; als Voraussetzung dazu werden unter Zugrundelegung der Arbeiten von Scatchard et al. (35 - 39) über das Bindungsverhalten von Serumalbumin die Bindungszahlen der spezifischen Anionenbindung berechnet (Abschnitt 5.2).

In Abschnitt 5.4 und 5.5 wird die Änderung des spezifischen Volumens abgeschätzt, die durch den Entzug der gebundenen Ionen aus dem Lösungsraum des freien Wassers verursacht wird. Die Meßgröße $\Delta(v/w_1)$ wird als Summe der Volumenänderung aufgrund hydrophober Wechselwirkung der Anionen und der Volumenänderung aufgrund der Bindung der Anionen an RSA dargestellt. Somit kann eine effektive Volumenzunahme bei der Anionenbindung angegeben werden.

5.1 pH-Messungen und Wasserstoffionenbindung

Das partielle spezifische Volumen von Proteinen ändert sich bei Bindung von H^+ - und OH^- -Ionen; es finden dabei folgende Reaktionen statt (40):



Inwieweit diese Vorgänge zu den gemessenen Änderungen des spezifischen Volumens der ternären Lösungen beitragen, kann durch Messung der Änderung der H^+ -Konzentration festgestellt werden. Nach Rasper und Kauzmann (40,41) beträgt die Volumenänderung pro Mol gebundener H^+ -Ionen 11 cm^3 .

Der pH-Wert von H_2O -RSA-KCl- und H_2O -RSA-KJ-Mischungen wurde bei verschiedenen Protein- und Salzkonzentrationen gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 11 dargestellt. Es zeigt sich, daß die Änderung des pH-Wertes im betrachteten Konzentrationsbereich nur von der Salzmolalität b abhängt und im Rahmen der Meßgenauigkeit unabhängig von der Proteinkonzentration ist: zwischen einer Lösung mit 5% RSA-Anteil und einer Lösung mit 26% RSA-Anteil bei gleichem Salzgehalt kann kein Unterschied im pH-Wert erkannt werden. Rinder-serumalbumin verhält sich hier ähnlich einem Puffer. Der pH-Wert salzfreier RSA-Lösung beträgt bei 12 Gew.% Protein 4,35 und bei 25 Gew.% 4,0.

Zur Abschätzung der durch die H^+ -Bindung verursachten Volumenänderung in einer RSA-KCl-Lösung wird eine Mischung mit $\alpha_2 = 0,25$ und einer Molalität $b = 1,2 \text{ mol kg}^{-1}$ betrachtet; der pH-Wert dieser Mischung beträgt 5,6. Die Abnahme der H^+ -Konzentration gegenüber salzfreier Lösung beträgt also $9,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol kg}^{-1}$.

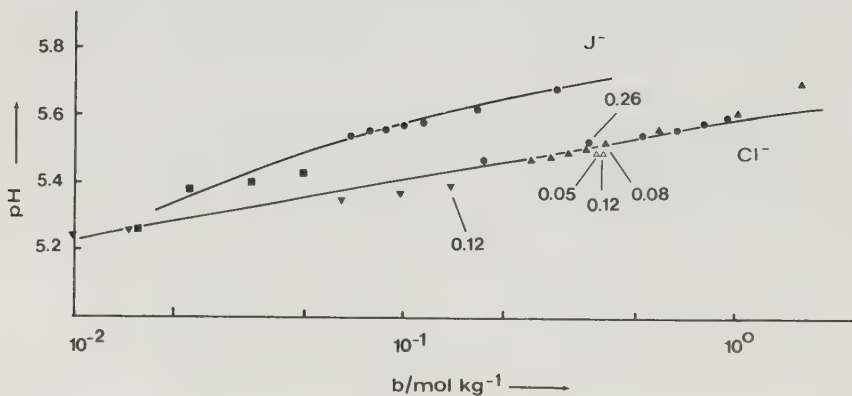


Abbildung 11: pH-Wert von H_2O -RSA-KCl- und H_2O -RSA-KJ-Mischungen bei 25°C in Abhängigkeit von der Salzmolalität b . Die Zahlen geben die RSA-Konzentration α_2 an.

KCl:

- gemessen bei konstanter RSA-Konzentration:
 $\alpha_2 = 0,26$
- ▲ gemessen bei konstantem RSA/KCl-Verhältnis:
 $\alpha_3 = 0,25$
- ▼ gemessen bei konstanter RSA-Konzentration:
 $\alpha_2 = 0,12$

KJ:

- gemessen bei konstantem RSA/KJ-Verhältnis:
 $\alpha_3 = 0,17$
- gemessen bei konstanter RSA-Konzentration:
 $\alpha_2 = 0,12$

Mit der von Kauzmann genannten Volumenänderung von 11 cm^3 pro Mol gebundener H^+ -Ionen ergibt dies eine Änderung des spezifischen Volumens der Lösung $\Delta v_{\text{H}^+} = 1,1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Die gemessene Volumenänderung bei dieser Mischung beträgt dagegen $\Delta v_{\text{exp}} = 5,87 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Ähnliche Werte ergeben sich für eine RSA-KJ-Lösung mit $\alpha_2 = 0,25$ und $b = 0,47 \text{ mol kg}^{-1}$: der pH-Wert dieser Lösung beträgt 5,7 und dies ergibt eine Änderung (Abnahme) der H^+ -Konzentration von $9,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol kg}^{-1}$ und damit ein $\Delta v_{\text{H}^+} = 1,1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ der gemessene Wert für die Änderung des spezifischen Volumens dieser Mischung ist $\Delta v_{\text{exp}} = 3,3 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Die Änderung des spezifischen Volumens ternärer Mischungen, die auf die Bindung von H^+ -Ionen zurückzuführen ist, ist also um 2 - 3 Größenordnungen kleiner als die gemessenen Änderungen. Die Bindung von H^+ -Ionen an RSA-Moleküle kann also nicht für die tatsächlichen Volumenänderungen verantwortlich sein.

5.2 Spezifische Anionenbindung

Unter Zugrundelegung der Debye-Hückel-Theorie elektrostatischer Wechselwirkung mit ihren vereinfachenden Voraussetzungen - nur Coulomb-Kräfte sind maßgebend, Ionen mit kugelsymmetrischem Feld, die Energie der interionischen Wechselwirkung $\ll kT$ (mit Boltzmann-Konstante k und abs. Temperatur T) - untersuchte und berechnete Scatchard (35 - 37) die Bindungszahlen kleiner Ionen an RSA-Molekülen. Die Bindungsplätze werden in Klassen unterschiedlicher Bindungskonstanten eingeteilt, wobei in jeder Klasse eine bestimmte Anzahl maximal verfügbarer Plätze besteht. Die Bindungszahl v_A für ein bestimmtes Anion A wird dann durch folgenden Ausdruck beschrieben:

$$(9) \quad v_A = \sum_i \frac{n_i K_i \alpha}{1 + \frac{K_i \alpha}{\alpha}}$$

mit
$$\alpha = a \exp \left\{ - 2 w z_p z_A \right\}$$

- wobei: n_i Anzahl der Bindungsplätze der Klasse i
 K_i Bindungskonstante der Klasse i (Dimension: kg mol^{-1})
 z_p, z_A Anzahl der Elementarladungen von Protein bzw. Anion
 a Aktivität der Anionen (Dimension: mol kg^{-1})

Die Aktivität a wird durch das chemische Potential μ , die Gaskonstante R und die absolute Temperatur T bestimmt:

$$a = \exp \left\{ \frac{\mu - \mu_0}{RT} \right\}$$

Die Größe w wird durch das elektrostatische Debye-Hückel-Potential W bestimmt; es gilt die Beziehung:

$$2 w z_p z_A = \frac{W}{kT}$$

mit
$$W = \frac{e^2 z_p z_A}{\epsilon} \left(\frac{1}{R} - \frac{\kappa}{1 + \kappa a} \right)$$

- e Elementarladung
 ϵ Dielektrizitätskonstante
 R Radius des Proteins
 a Abstand Anion - Protein
 κ reziproker Debye-Hückel-Radius

mit
$$\kappa = \sqrt{\frac{8 \pi e^2 N_A J}{\epsilon kT}}$$

N_A Avogadro-Konstante

J Ionenstärke

Für die Bindung von Cl^- , J^- und SCN^- an Rinderserumalbumin werden von Scatchard (37) drei Klassen von Bindungsplätzen angegeben mit folgenden maximal verfügbaren Plätzen n_i und Bindungskonstanten K_i :

Klasse	n_i	$K_i Cl^-$	$K_i J^-$	$K_i SCN^-$
1	1	2400	9240	46200
2	8	100	385	1925
3	18	3,3	12,705	63,525

Mit diesen Werten und den von Reboiras (42) gemessenen Aktivitätskoeffizienten wurden die Bindungszahlen in Abhängigkeit von der RSA^- und Anionenkonzentration berechnet (Abbildung 12). *

Diese Bindungszahlen liegen allen folgenden Überlegungen und Abschätzungen von Volumenänderungen zugrunde. Man kann auch davon ausgehen (37), daß für Cl^- und J^- -Ionen die gleichen Bindungsplätze in Frage kommen.

* An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. Pfister für die Bereitstellung des Rechenprogramms an der PDP 8 seiner Arbeitsgruppe danken.

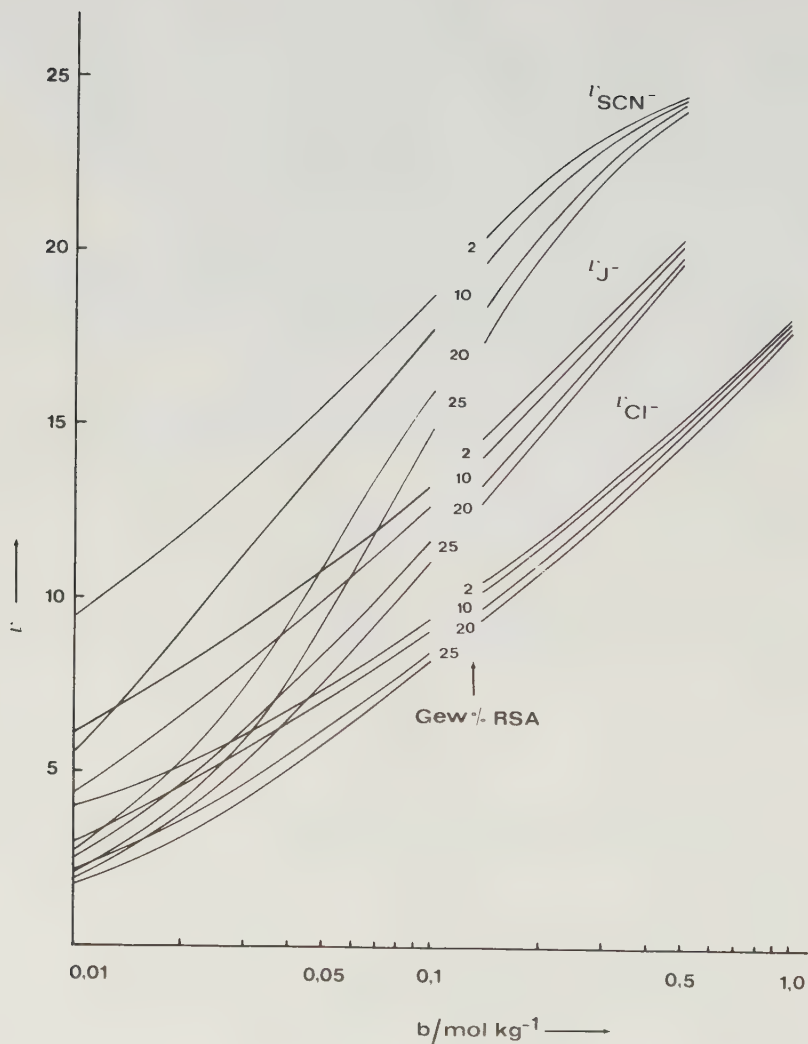


Abbildung 12: Zahl der von RSA gebundenen Anionen Cl^- , J^- und SCN^- in Abhängigkeit von der Salzmolalität b ; Parameter ist die RSA-Konzentration α_2 .

Die größere Affinität der J^- -Ionen kann dann ihre Ursache in der unterschiedlichen Debye-Hückel-Abschirmung bzw. Hydrathülle haben. Nach den von Bull (1,43) veröffentlichten Messungen der magnetischen Kernresonanz (NMR) bei der Bindung von Cl^- an Humanserumalbumin (HSA) und den hieraus entwickelten Modellen handelt es sich bei den Chloridbindungsplätzen um NH_3^+ -Gruppen von Aminosäureketten, die an der Spitze kegelförmiger Vertiefungen auf der Oberfläche des HSA-Moleküls gebunden sind, sich jedoch mit dem anderen Ende der Kette frei bewegen können. Die größere Hydrathülle des Cl^- -Ions (44) kann bei diesem Modell der Bindung die geringere Affinität zur Folge haben. Die von Bull an HSA gemachten Messungen können ohne weiteres auf RSA übertragen werden, da bei beiden Proteinen kein Unterschied im Cl^- -Bindungsverhalten besteht (45).

Die Bindung von K^+ kann bei den vorliegenden Messungen unberücksichtigt bleiben, da vorausgesetzt werden kann, daß das RSA-Molekül keine K^+ -Ionen spezifisch bindet (46,36, 2, 47,48).

5.3 Molarer Volumeneffekt bei der Bindung von Anionen an RSA

Ein Maß für den Einfluß der Anionenbindung auf das thermodynamische Verhalten des Proteins kann die Berechnung der Änderung des spezifischen Volumens pro Mol gebundener Anionen sein.

Nach dem von Rasper und Kauzmann entwickelten Modell (40) kann man sich das spezifische Volumen des Proteins aus drei Beiträgen zusammengesetzt denken: (i) Zunächst der Volumenbeitrag, der durch die Größe der einzelnen Atome und deren Bindungslängen zustandekommt und von dessen Änderung wohl abgesehen werden kann. (ii) Da die Aminosäuren und Polypeptidketten des RSA-Moleküls jedoch keine

regelmäßige Struktur, wie etwa ein Kristall, bilden, sondern mehrfach gefaltet und verschlungen sind, entstehen Hohlräume bzw. komprimierte Gebiete, die einen weiteren Beitrag zum partiellen spezifischen Volumen liefern. (iii) Wie alle Elektrolyte, die sich in Lösung befinden, verändert schließlich auch das RSA-Molekül - als Polyelektrolyt mit ca. 100 positiven und 100 negativen Ladungen auf der Oberfläche (am isoelektrischen Punkt) - durch Elektrostriktion bzw. hydrophobe Wechselwirkung die Struktur des umgebenden Wassers. Andererseits können Wassermoleküle einige der Hohlräume des Makromoleküls besetzen, was wiederum Strukturänderungen zur Folge haben kann. Hinzu kommt noch, daß bei der Bindung von Ionen an RSA sich die Ladungsverteilung und damit die elektrostriktive Wirkung der Ladungsträger ändert. Diese kurze und sicher nicht vollständige Aufzählung zeigt schon die Komplexität der verschiedenen Beiträge zum spezifischen Volumen gelöster Stoffe. Die gemessene Änderung des spezifischen Volumens einer ternären Mischung ist also stets die Summe einer Vielzahl unterschiedlicher Vorgänge.

Ein möglicher Beitrag zur Untersuchung der molekularen Struktur und des thermodynamischen Zustandes von Proteinen kann die Berechnung des molaren Volumeneffektes sein, d.h. die Berechnung der Volumenänderung der ternären Lösung pro Mol gebundener Anionen aus der gemessenen Änderung des spezifischen Volumens der Mischung. Die Änderung des spezifischen Volumens der ternären Mischung bezüglich der addierten Beiträge der binären Mischungen

$$\Delta v = v - v_1^0 w_1 - \phi_2 w_2 - \phi_3 w_3 \quad (\text{s. Abschnitt 3})$$

läßt sich darstellen als Produkt der spezifischen Volumenänderung pro Gramm gebundener Anionen Δv_3 und dem Massenbruch gebundener Anionen

$$w_{3b} = \frac{m_{3b}}{m_1 + m_2 + m_3} :$$

$$(10) \quad \Delta v = \Delta v_3 \cdot w_{3b}$$

bzw. nach Einführung der molaren Volumenänderung $\Delta V_3 = \Delta v_3 \cdot M_3$:

$$(11) \quad \Delta v = \Delta V_3 \frac{1}{M_3} w_{3b}.$$

Andererseits gilt für den Massenbruch w_{3b} :

$$(12) \quad w_{3b} = b_b M_3 w_1.$$

Damit erhält man aus (11)

$$\Delta v = \Delta V_3 b_b w_1$$

$$(13) \quad \Delta \frac{v}{w_1} = \Delta V_3 \cdot b_b$$

Die Meßpunkte v wurden in der Form $\Delta (v/w_1) = \beta_{11} \zeta_2 \zeta_3$ dargestellt; dies läßt sich - mit der Salzmolalität b - umschreiben

$$(14) \quad \Delta (v/w_1) = \beta_{11} M_2 M_3 b_2 b.$$

Mit der Definition der Molalität gebundener Anionen

$b_b = v \cdot b_2$ erhält man aus (13) und (14):

$$(15) \quad \Delta V_3 = \beta_{11} M_2 M_3 b/v.$$

Anhand dieser Herleitung sieht man auch, daß die zunächst rein formal eingeführte Berechnung der Quotienten $\Delta (v/w_1)$

durchaus eine physikalische Bedeutung besitzt:

$$(16) \quad \Delta (v/w_1) = \Delta \frac{V}{m_1} = \Delta V_3 \cdot b_b \quad .$$

Mit den aus den Messungen erhaltenen Werten für β_{11} und den aus dem Scatchard-Ansatz berechneten Bindungszahlen für Cl^- , J^- und SCN^- kann der molare Volumeneffekt berechnet werden. In dem untersuchten Konzentrationsbereich, d.h. für RSA-Konzentrationen $\alpha_2 \leq 0,25$ und Salzmolalitäten $0,01 < b < 1,3 \text{ mol kg}^{-1}$ im Fall des KCl bzw. $0,01 < b < 0,5 \text{ mol kg}^{-1}$ für KJ und KSCN ist nach den vorliegenden Messungen die Volumenzunahme pro Gramm Wasser proportional zu dem Produkt der Massenverhältnisse $\zeta_2 \zeta_3$; auch bei größeren Konzentrationen, $\alpha_2 = 0,40$ bzw. $b = 2,16 \text{ mol/kg}$ ist im Fall der H_2O -RSA-KCl-Mischung diese Linearität noch erfüllt. Die Messungen lassen jedoch keine exakte Aussage bezüglich des Wechselwirkungs-Terms zu, sobald man zu sehr kleinen Konzentrationen, d.h. für $\zeta_2 \zeta_3 < 10^{-3}$, übergeht. Aus diesem Grund wurde auch die molare Volumenänderung nur für Salzmolalitäten $b > 0,01 \text{ mol kg}^{-1}$ berechnet.

Abbildung 13 zeigt das Ergebnis für die Anionen Cl^- , J^- und SCN^- in jeweils einer RSA-Lösung von 2 Gew.% bzw. 20 Gew.% in Abhängigkeit von der Salzmolalität b . Die Volumenänderung bei der Bindung von J^- ist aus den H_2O -RSA-KJ-Mischungen gewonnen; bei der äquivalenten Messung mit NaJ erhält man ΔV_3 -Werte, die nur um 3% höher liegen, also noch weit innerhalb der Schwankungsbreite, die sich aus einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% in β_{11} ergibt. Die Abweichung muß auch verschwindend klein sein, da die Kationen in der ternären Mischung im gleichen Zustand vorliegen wie in einer binären Wasser-Salz-Mischung und nur das Anion J^- eine Bindung mit dem RSA-Molekül eingeht.

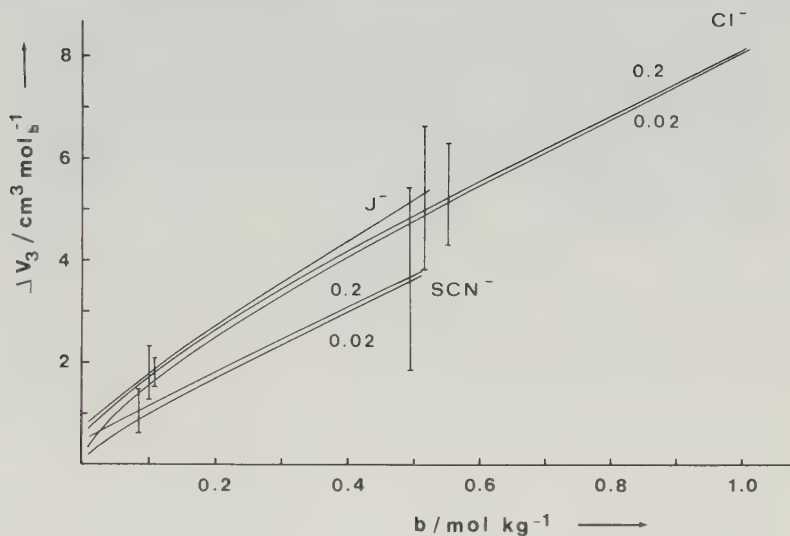


Abbildung 13: Molare Volumenzunahme in Abhängigkeit von der Salzmolalität b der Mischung. Die eingezeichneten Fehler entsprechen 5% Irrtumswahrscheinlichkeit. Parameter ist jeweils der RSA-Anteil $\alpha_2 = 0,20$ bzw. $0,02$ (bei J^- nur $\alpha_2 = 0,20$)

Bei gleicher Salzmolalität b der Lösung kann innerhalb der Fehlergrenzen bei den hier verwendeten Elektrolyten KCl , KJ und KSCN kein signifikanter Unterschied in der Volumenzunahme pro Mol gebundener Anionen festgestellt werden, obwohl bei gleichem b die Anzahl gebundener Thiocyanationen mehr als doppelt so groß ist als die Anzahl gebundener Chloridionen. Im folgenden Kapitel soll dieser Sachverhalt ausführlicher diskutiert werden.

5.4 Einfluß der Elektrostriktion bzw. hydrophober Wechselwirkung der Anionen auf das spezifische Volumen

Das gemessene spezifische Volumen einer Salzlösung kann in verschiedene Beiträge aufgegliedert werden. Da das Salz dissoziiert vorliegt, wird zunächst das partielle spezifische Volumen in unendlicher Verdünnung, v_3^∞ , nach Kationen und Anionen separiert:

$$(17) \quad v_3^\infty = v_3^{\infty-} + v_3^{\infty+} ;$$

bzw. bei Verwendung molarer Größen:

$$(18) \quad v_O^O = v_-^O + v_+^O .$$

Die partiellen molaren Volumen von Ionen konnten erstmals von Zana und Yeager mit der Messung von Ultraschall-Schwingungs-Potentialen direkt angegeben werden (56). Andere Autoren (22, 50, 54) benutzen die halbempirische Beziehung $v^O = A r^3 - B z^2 \frac{1}{r}$ (für Kationen und Anionen) mit dem Ionenradius r und der Zahl der Ladungen des Ions z ; A und B sind aus dem Experiment gewonnene Konstanten. Die Zahlenwerte der partiellen molaren Volumen der Ionen liegen in der Literatur vor (22,44,49-52). Nach den Vorstellungen des Frank-Wen-Modells (53) setzt sich das partielle molare Volumen der Ionen, v_+^O bzw. v_-^O , aus mehreren Beiträgen zusammen (22,50,51):

$$(19) \quad v_+^O = v_+^O (\text{intr}) + v_+^O (\text{elect}) + v_-^O (\text{struct})$$

$$v_-^O = v_-^O (\text{intr}) + v_-^O (\text{elect}) + v_-^O (\text{struct})$$

Hier bedeutet V^O (intr) das intrinsische Volumen der Ionen, das auch im Kristall vorliegt; V^O (elect) ist die Volumenänderung durch Elektrostriktion, die durch die Drude-Nernst'sche Formel beschrieben wird; V^O (struct) beschreibt die Volumenänderung aufgrund anderer Wechselwirkung. Während die klassische Elektrostriktion grundsätzlich eine Abnahme des spezifischen Volumens der Lösung bedeutet, kann durch eine zusätzliche Strukturänderung V^O (struct) des Wassers aufgrund hydrophober Wechselwirkung auch eine Volumenzunahme entstehen. Je nachdem, welcher Beitrag, V^O (elect) oder V^O (struct), überwiegt, spricht man von "strukturbildenden" oder von "strukturbrechenden" Ionen.

Den Arbeiten von Padova zufolge (52) liegt die Ursache für dieses unterschiedliche Verhalten der Ionen in der Feldstärkeabhängigkeit der Dielektrizitätskonstanten. Nur bei Ionen, deren Radius r innerhalb des Bereiches konstanter DK liegt (bei einwertigen Ionen $r \leq 1,8 \text{ \AA}$), tritt eine Solvathülle größerer Dichte auf ("strukturbildend"); einwertige Ionen, deren Radius größer als $1,8 \text{ \AA}$ ist, wirken "strukturbrechend". Der Einfluß der Ionen auf die Struktur des umgebenden Wassers ist somit eine Funktion sowohl des Radius als auch der Ladung der Ionen.

In der Literatur (49,44) wird als Elektrostriktion häufig die Differenz des partiellen molaren Volumens in unendlicher Verdünnung und des intrinsischen Volumens bezeichnet:

$$(20) \quad \bar{V}^O (\text{elect}) = V^O (\text{intr}) - V^O \quad (*)$$

Die klassische Elektrostriktion und die Strukturveränderungen des Lösungsmittels Wasser durch hydrophobe Wechselwirkung werden also zusammengefaßt und es ergeben sich für die Größe $\bar{V}^O$ (elect) positive oder negative Werte. Die Kenntnis dieser Zusammenhänge ist nötig, will man die Volumenbeiträge, die bei der Bindung an Protein-Molekülen auftreten,

* Da im folgenden nur Anionen betrachtet werden, wird der Index + bzw. - weggelassen; Größen ohne Index bezeichnen das molare Volumen der Anionen.

separieren. Bei den folgenden Überlegungen können wegen der spezifischen Anionenbindung die Volumenbeiträge der Kationen unberücksichtigt bleiben.

Bei der Berechnung von $\Delta (v/w_1)$ wird die Größe $\phi_3 \zeta_3$ - das scheinbare spezifische Volumen multipliziert mit dem Massenverhältnis - vom gemessenen Wert v/w_1 abgezogen; tatsächlich enthält die ternäre Mischung jedoch weniger Anionen, als zur Berechnung von $\phi_3 \zeta_3$ angesetzt wurde. Die effektive Anionenmolalität ist um den Betrag der gebundenen Ionen verringert:

$$b_{\text{eff}}^{\text{Anion}} = b^{\text{Anion}} - b_{\text{bound}}^{\text{Anion}}$$

Zur Berechnung des wahren molaren Volumeneffektes muß also entsprechend der Molalität gebundener Ionen b_D der Volumenbeitrag

$$\left\{ v^O (\text{elect}) + v^O (\text{struct}) \right\} = f (b_D)$$

berücksichtigt werden; das intrinsische Ionenvolumen $v^O (\text{intr})$ kann als unverändert angesehen werden.

Werden Anionen aus der Lösung an RSA gebunden, so geht das elektrostriktiv veränderte Wasser (bzw. hydrophob verändert) wieder in den Zustand des freien Wassers über; die daraus resultierende Volumenänderung erhält man als Differenz des intrinsischen Volumens v^i und dem partiellen molaren Volumen in unendlicher Verdünnung v^O :

$$(21) \quad \Delta v_e = v^i - v^O$$

Die Werte für das intrinsische und das partielle molare Volumen liegen in der Literatur vor (22,33,49,52).

Das intrinsische Volumen wird mit der Beziehung

$$v^i = N_A \frac{4}{3} \pi (r + a)^3 \text{ berechnet, wobei der Ionenradius im}$$

Kristall, r , durch den Ionenradius in Lösung, $r + a$, ersetzt wird (22,54,55,65); die Größe a liegt bei den verschiedenen Autoren zwischen $0,2 \text{ \AA}$ und $0,5 \text{ \AA}$. Bei der Bestimmung des partiellen molaren Ionenvolumens treten Differenzen auf, da diese Werte (außer bei den Messungen von Zana und Yeager) aus dem partiellen Volumen des neutralen Elektrolyten abgeleitet sind. Es ist üblich, auf der Grundlage des berechneten Volumens des hydratisierten Protons die partiellen Molvolumen anderer Ionen abzuleiten. Nach einer Zusammenfassung von Millero (22) und Mukerjee (54,55) aller verfügbaren Literaturwerte ergibt sich als Mittelwert

$$V^{\circ}(\text{H}^{+}) = -4,5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}.$$

In Tabelle 4 sind einige Werte für das partielle molare Volumen der verwendeten Ionen zusammengestellt, deren Unterschiede durch die Annahme verschiedener Werte von $V^{\circ}(\text{H}^{+})$ zustandekommen. Padova bestimmt seine Werte auf der Grundlage von $V^{\circ}(\text{H}^{+}) = -0,9 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$; aus diesem Grund weichen auch die partiellen Molvolumen vom Durchschnittswert der anderen Autoren ab. Das partielle molare Volumen in unendlicher Verdünnung V°_{O} der verwendeten Elektrolyte - KCl, KJ, KSCN - wurde gemessen (s. Kapitel 4.2); um die entsprechenden partiellen Volumen der Ionen zu erhalten, wurden die Literaturwerte für $V^{\circ}(\text{K}^{+})$ von den gemessenen Werten abgezogen:

$$(22) \quad V^{\circ}_{\text{O exp}} - V^{\circ}_{+}(\text{K}^{+}) = V^{\circ'}.$$

Die so erhaltenen Werte für $V^{\circ'}$ sind ebenfalls in Tabelle 4 zusammengefaßt. Für $V^{\circ}_{\text{O exp}}$ wurde erhalten (s. Kapitel 4.2):

$$V^{\circ}_{\text{O exp}}(\text{KCl}) = 26,99 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$$

$$V^{\circ}_{\text{O exp}}(\text{KJ}) = 45,22 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$$

$$V^{\circ}_{\text{O exp}}(\text{KSCN}) = 50,03 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}.$$

Tabelle 4: Zusammenstellung der partiellen Molvolumen

	$\frac{V_+^O(\text{Na}^+)}{\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}}$	$\frac{V_+^O(\text{K}^+)}{\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}}$	$\frac{V_-^O(\text{Cl}^-)}{\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}}$	$\frac{V_-^O(\text{J}^-)}{\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}}$	$\frac{V^{O'}(\text{Cl}^-)}{\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}}$	$\frac{V^{O'}(\text{J}^-)}{\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}}$	$\frac{V^{O'}(\text{SCN}^-)}{\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}}$
Friedman (33)	- 6,6	3,6	23,2	41,6	23,4	41,6	46,4
Millero (22)	- 5,7	4,5	22,3	40,8	22,5	40,7	45,5
Conway (49) ₁₎	- 7,0	3,3	23,6	42,2	23,7	41,9	46,7
2)	- 7,4	3,4	23,7	41,4	23,6	41,8	46,6
Padova (52)	- 2,2	8,2	18,6	37,1	18,8	37,0	41,8

1) Conway et al. (1966)

2) Zana, Yeager (1966) (56)

In Spalte 1 - 4 stehen die von den Autoren veröffentlichten Zahlenwerte; die in Spalte 5 - 7 stehenden Werte ergeben sich aus den gemessenen partiellen molaren Volumina in unendlicher Verdünnung $V_+^O \exp - V_+^{O'}(\text{K}^+)$

Eine Zusammenstellung intrinsischer Molvolumen findet sich bei Conway (49,57): Berechnete Werte aus den Ionenradien von Pauling und den neueren Arbeiten von Gourary und Adrian (58) und die experimentellen Daten von Padova, die aus Dichte- und Kompressionsmessungen gewonnen sind (52).

Für alle Kationen (und auch für zwei- und dreiwertige Anionen) ist $v^i > v^o$; die einwertigen Anionen werden dagegen in der Regel zu den "structure breaking"-Ionen gezählt, da hier $v^i < v^o$ ist. Das bedeutet, daß beim Entzug einwertiger Ionen aus der Lösung das spezifische Volumen der Lösung abnimmt. Unter der Annahme, daß bei der Anionenbindung an RSA das gesamte hydrophob gebundene Wasser der Anionen in den Zustand des freien Wassers übergeht, müßte eine Abnahme des spezifischen Volumens festgestellt werden. Tatsächlich wird jedoch eine Zunahme gemessen. Diese kann durch Veränderung der Hydrathülle des Proteins oder durch Strukturänderungen hervorgerufen werden. In Abbildung 14 sind gemessene Volumenänderungen $\Delta (v/w_1)$, sowie der Beitrag, der sich aus der hydrophoben Wechselwirkung der gebundenen Anionen ergeben würde, dargestellt. Letzterer wird mit den Literaturdaten v^i und $v^{o'}$ durch folgende Beziehung berechnet:

$$(23) \quad \Delta \frac{v}{w_1} (b_b) = \Delta v_e \cdot b_b = (v^i - v^{o'}) \cdot b_b$$

Für das intrinsische Volumen sind die Werte von Padova eingesetzt.

Die Volumenänderung der ternären Mischung wird mit dem experimentell bestimmten β_{11} aus Gleichung (14) berechnet:

$$(24) \quad \Delta \frac{v}{w_1} (b_b) = \beta_{11} M_2 M_3 \left\{ \frac{b \cdot b_b}{v} (b_2) \right\}$$

mit der RSA-Molalität b_2 als Parameter.

Aufgrund der positiven bzw. negativen Steigungen ist ersichtlich, daß die bei der Anionenbindung erzeugte

Tabelle 5: Zusammenstellung intrinsischer Molvolumen

		$\frac{V^i(\text{Na}^+)}{3 \text{ mol}^{-1}}$ cm ³ mol ⁻¹	$\frac{V^i(\text{K}^+)}{3 \text{ mol}^{-1}}$ cm ³ mol ⁻¹	$\frac{V^i(\text{Cl}^-)}{3 \text{ mol}^{-1}}$ cm ³ mol ⁻¹	$\frac{V^i(\text{J}^-)}{3 \text{ mol}^{-1}}$ cm ³ mol ⁻¹	$\frac{V^i(\text{SCN}^-)}{3 \text{ mol}^{-1}}$ cm ³ mol ⁻¹
Conway	1)	5,0	11,5	25,3	40,1	--
	2)	8,4	15,3	19,6	35,0	--
Padova		6,4	15,3	20,7	37,1	41,3

1) aus Ionenradien von Pauling berechnet

2) aus Ionenradien von Gourary und Adrian berechnet

Volumenänderung teilweise durch die Volumenänderung durch hydrophobe Wechselwirkung kompensiert wird.

Wird das aus der Messung H_2O -RSA-NaJ bestimmte β_{11} herangezogen, so verschieben sich die Ordinatenwerte praktisch nicht. Der Korrekturfaktor lautet:

$$\frac{\Delta (v/w_1) \text{ (KJ)}}{\Delta (v/w_1) \text{ (NaJ)}} = \frac{\beta_{11} \text{ (KJ)} \cdot M_3 \text{ (KJ)}}{\beta_{11} \text{ (NaJ)} \cdot M_3 \text{ (NaJ)}} = \frac{2,98818}{3,08773}$$

$$\Delta (v/w_1) \text{ (NaJ)} = 1,0333 \cdot \Delta (v/w_1) \text{ (KJ)}$$

Abbildung 14: Gemessene Volumenänderung $\Delta (v/w_1)$ in Abhängigkeit von der Molalität gebundener Anionen für RSA-Konzentrationen $\alpha_2 = 0,02, 0,10, 0,20, 0,25$

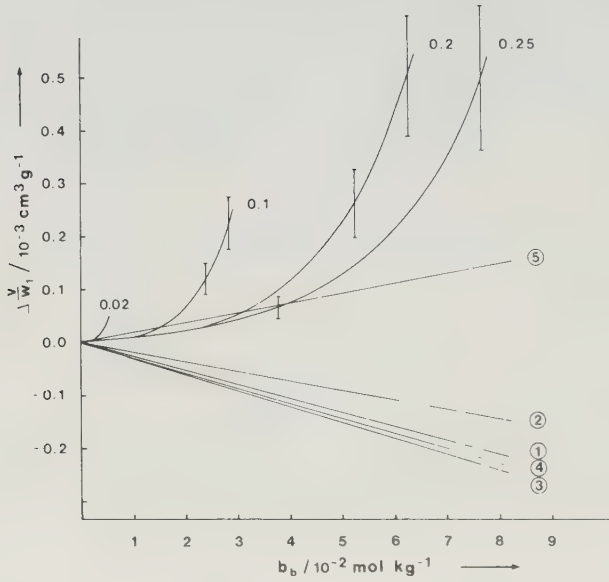


Bild a: Messung H_2O - RSA - KCl

- | | |
|--|------------|
| ① $\Delta V_e = - 2,7 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ | (Friedman) |
| ② $\Delta V_e = - 1,8 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ | (Millero) |
| ③ $\Delta V_e = - 3,0 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ | (Conway) |
| ④ $\Delta V_e = - 2,9 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ | (Zana) |
| ⑤ $\Delta V_e = + 1,9 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ | (Padova) |

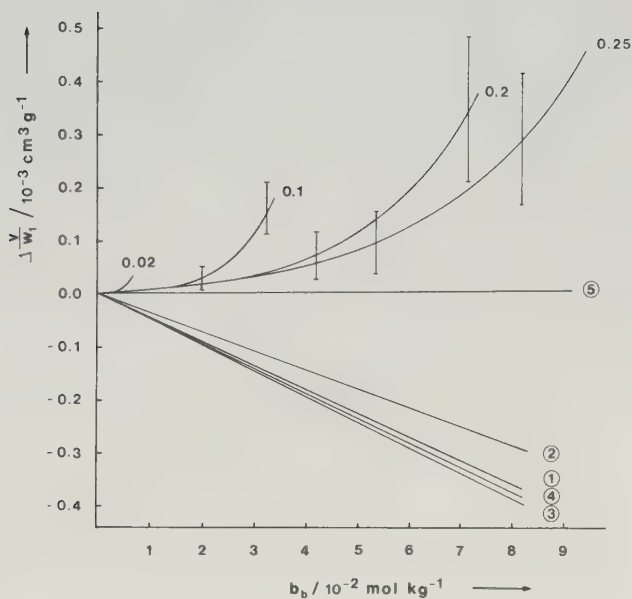


Bild b: Messung H₂O - RSA - KJ

- | | | |
|---|--|------------|
| ① | $\Delta V_e = - 4,5 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ | (Friedman) |
| ② | $\Delta V_e = - 3,6 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ | (Millero) |
| ③ | $\Delta V_e = - 4,8 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ | (Conway) |
| ④ | $\Delta V_e = - 4,7 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ | (Zana) |
| ⑤ | $\Delta V_e = + 0,1 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ | (Padova) |

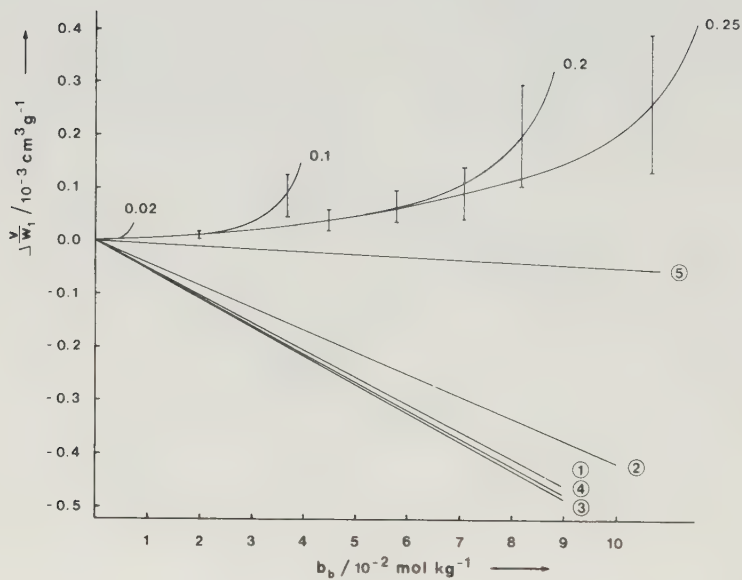


Bild c: Messung H_2O - RSA - KSCN

- | | | |
|---|--|------------|
| ① | $\Delta V_e = - 5,1 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ | (Friedman) |
| ② | $\Delta V_e = - 4,2 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ | (Millero) |
| ③ | $\Delta V_e = - 5,4 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ | (Conway) |
| ④ | $\Delta V_e = - 5,3 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ | (Zana) |
| ⑤ | $\Delta V_e = - 0,5 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ | (Padova) |

Durch die Einführung des Volumenterms $\{ V^O \text{ (elect)} + V^O \text{ (struct)} \}$ der gebundenen Anionen können zwei zunächst nicht verständliche Tatsachen erklärt werden:

- 1) Für das System $\text{H}_2\text{O-RSA-KJ}$ wird ein kleineres β_{11} gemessen, als für $\text{H}_2\text{O-RSA-KCL}$ (s. Tabelle 3), obwohl Jodid eine größere Affinität (37,59) besitzt und folglich auch eine größere Volumenänderung erwartet wird. Ebenso wird für das System $\text{H}_2\text{O-RSA-KSCN}$ nahezu das gleiche β_{11} gemessen, wie für die entsprechende KCl -Mischung. Da Thiocyanat jedoch die größte Affinität der verwendeten Anionen besitzt, sollte auch hier der größte Wechselwirkungsterm erwartet werden.
- 2) Bei der Berechnung des molaren Volumeneffektes ΔV_3 (Abbildung 13) wird für eine bestimmte Molalität b nahezu das gleiche ΔV_3 für J^- und Cl^- erhalten, obwohl bei gleichem b die Bindungsmolalität b_b für J^- wesentlich größer ist und also auch ΔV_3 größer sein müßte. Umgekehrt ergibt sich für SCN^- bei gleicher Ausgangsmolalität ein kleinerer molarer Volumeneffekt, obwohl auch hier die Bindungsmolalität wesentlich größer ist als für Chlorid (37).

Erklärung:

Die positive Volumenänderung, die bei der Anionenbindung auftritt, wird durch die negative Volumenänderung beim Entzug der Anionen aus dem Lösungsraum des freien Wassers teilweise kompensiert. Dieser letztere Beitrag ist für J^- wegen der stärkeren hydrophoben Eigenschaften (22,52) größer und verringert die positive Volumenänderung in einem stärkeren Maß als im Fall des Cl^- . Dies gilt - in verstärktem Maß - auch für die Thiocyanationen, deren hydrophobe Wechselwirkung mit dem umgebenden Wasser wiederum stärker ist als bei den Jodidionen.

5.5 Effektiver molarer Volumeneffekt

Die gemessene Änderung des spezifischen Volumens der ternären Mischung stellt einen Bruttoeffekt dar, der einerseits durch die Bindung der Anionen an RSA, andererseits durch den Entzug der Anionen aus dem Lösungsraum des freien Wassers verursacht wird. Da die verwendeten Ionen, Cl^- , J^- und SCN^- , zu den strukturbrechenden Ionen zählen, kompensieren sich beide Effekte teilweise. Die effektive Volumenänderung, die bei der Bindung von Anionen an RSA erzeugt wird, setzt sich infolgedessen aus beiden Beiträgen zusammen:

$$(25) \quad \Delta (v/w_1)_{\text{eff}} = |v^i - v^{O'}| \cdot b_b + \beta_{11} M_2 M_3 \frac{b_b}{v}$$

Die auf diese Art berechneten Werte sind in Abbildung 15 dargestellt. Für das intrinsische Molvolumen v^i sind die Zahlen von Padova genommen, zur Bestimmung des partiellen Molvolumens $v^{O'}$ ist für v^O (K^+) der Zahlenwert von Friedman eingesetzt (s. Gl. (22) und Tab. 4 und 5).

(Zur Diskussion der Unsicherheiten s. Kapitel 5.5.1).

Im Rahmen der Fehlergrenzen kann kein wesentlicher Unterschied in der Volumenänderung ternärer Gemische bei der Bindung von Cl^- , J^- und SCN^- festgestellt werden: Bei gleicher Molalität gebundener Ionen zeigt sich die gleiche Expansion der ternären Mischung. Die Unterschiede, die sich im Wechselwirkungskoeffizienten β_{11} zeigen, können durch die unterschiedliche hydrophobe Wechselwirkung der Anionen mit dem umgebenden Wasser erklärt werden.

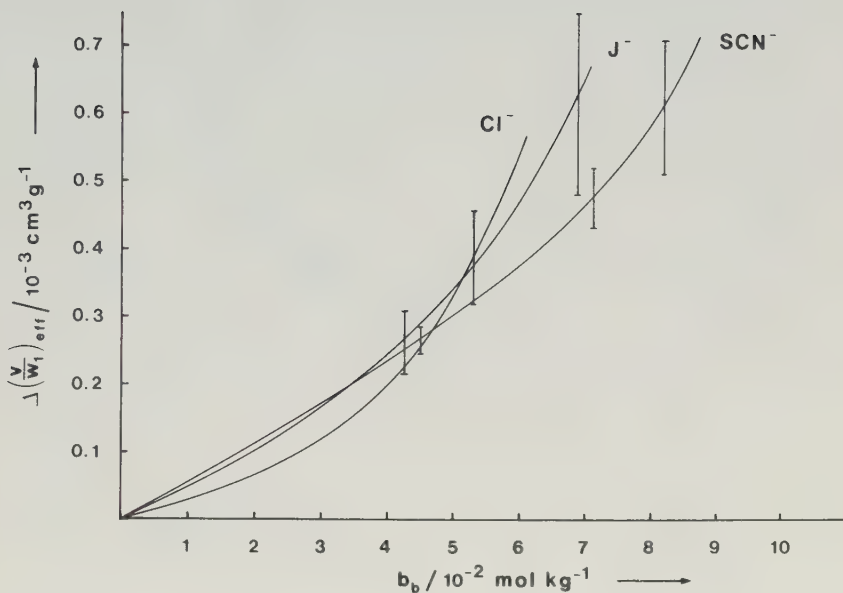


Abbildung 15 a): Effektive Volumenänderung pro Gramm Wasser in Abhängigkeit von der Molalität gebundener Ionen. Die Fehlerbalken entsprechen 95% Vertrauensbereich in β_{11} .
Bild a): 20%ige RSA-Konzentration

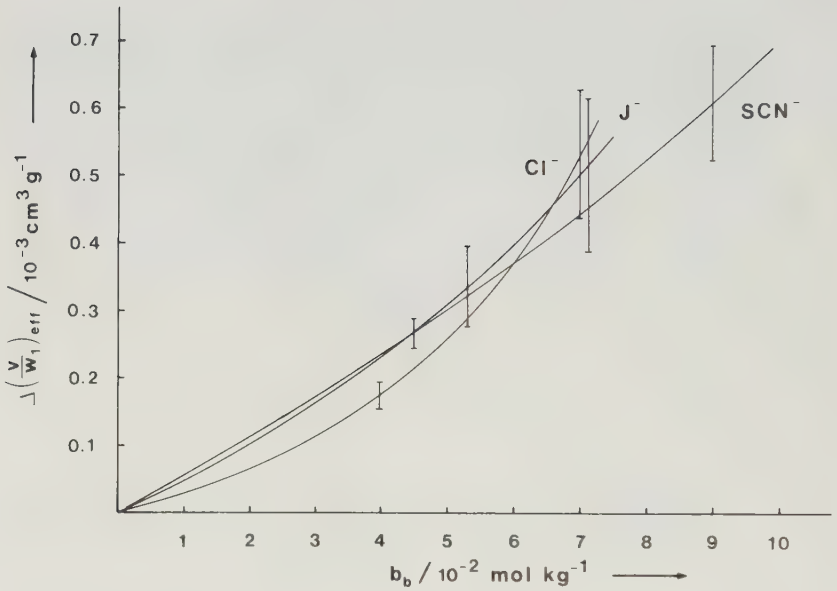


Abbildung 15 b): Effektive Volumenänderung pro Gramm Wasser in Abhängigkeit von der Molalität gebundener Ionen. Die Fehlerbalken entsprechen 95% Vertrauensbereich in β_{11} .
Bild b): 25%ige RSA-Konzentration

Um diese Volumenänderung mit entsprechenden Effekten bei der Bindung anderer Ionen bzw. bei Neutralisationsreaktionen zu vergleichen, ist es zweckmäßig, den effektiven molaren Volumeneffekt $\Delta V_{3\text{eff}}$ zu berechnen:

$$\begin{aligned} (26) \quad \Delta V_{3\text{eff}} &= \Delta V_e + \Delta V_3 = \\ &= |v^i - v^{O'}| + \beta_{11} M_2 M_3 b/v \end{aligned}$$

Diese Größe ist in Abbildung 16 in Abhängigkeit von der Molalität gebundener Ionen dargestellt.

Nach Rasper/Kauzmann (40,41) beträgt die Volumenzunahme bei der Bindung von H^+ bzw. OH^- 11 cm^3 bzw. 17 cm^3 pro gebundener Mole und diese Zunahme ist unabhängig von der Größe b_b (40). Dagegen wird bei den vorliegenden Messungen bei der Anionenbindung eine von der Bindungsmolalität abhängige Zunahme gemessen: bei kleinen Bindungszahlen beträgt die effektive Volumenzunahme weniger als 5 $\text{cm}^3 \text{mol}_b^{-1}$, mit zunehmender Besetzung der Bindungsplätze ergeben sich Werte $> 10 \text{ cm}^3 \text{mol}_b^{-1}$.

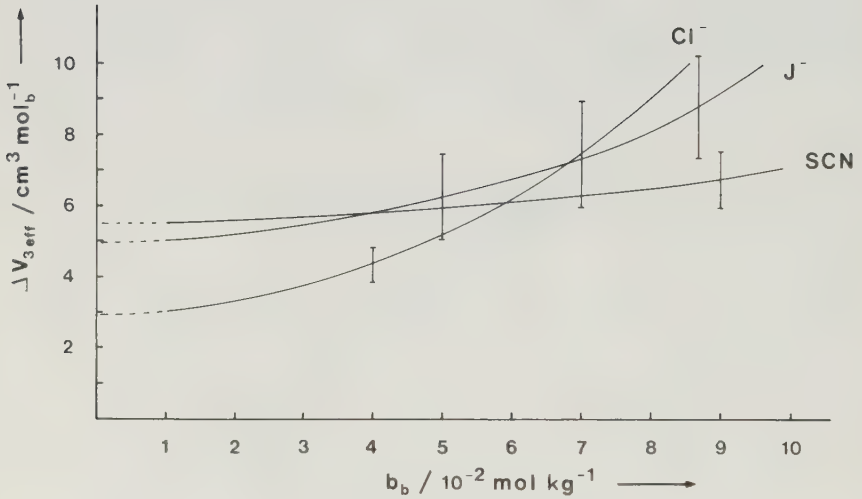


Abbildung 16: Effektive molare Volumenzunahme pro gebundener Mole in Abhängigkeit von der Molalität gebundener Ionen bei einer konstanten Proteinkonzentration von 25%

Für die Einzelmessungen mit sehr hohem RSA-Anteil (Abschnitt 4.3.1) sind nach Gleichung (26) ebenfalls effektive molare Volumenänderungen berechnet:

$$1) \quad \alpha_2 = 0,33, \quad b = 2,16 \text{ mol kg}^{-1}$$

$$b_b = 0,143 \text{ mol kg}^{-1}$$

$$\Delta V_{3\text{eff}} = 15,8 \text{ cm}^3 \text{mol}_b^{-1}$$

$$2) \quad \alpha_2 = 0,41 \quad , \quad b = 0,61 \text{ mol kg}^{-1}$$

$$b_b = 0,141 \text{ mol kg}^{-1}$$

$$\Delta V_{3\text{eff}} = 6,7 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$$

Bedenkt man, daß im ersten Fall nahezu alle Bindungsplätze besetzt sind (37), so kann als maximal mögliche Expansion ein Wert von $\Delta V_{3\text{eff}}$ von etwa $16 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$ abgeschätzt werden; die dabei vorliegenden Konzentrationsverhältnisse sind jedoch weit vom physiologischen Bereich entfernt.

Bei der Bindung von Thiocyanat beträgt das maximal mögliche $\Delta V_{3\text{eff}} \approx 10 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$.

Ein konstanter molarer Volumeneffekt würde nur auftreten, wenn es sich insgesamt um identische Bindungsplätze handeln würde; in diesem Fall wäre es gleichgültig, ob zwei Bindungsplätze besetzt sind oder 20 Plätze - die Volumenzunahme pro Mol gebundener Ionen wäre die gleiche. Der hier auftretende, von der Molalität gebundener Ionen b_b abhängige (zunehmende) molare Volumeneffekt $\Delta V_{3\text{eff}}$ ist eine Folge der Existenz verschiedener Klassen von Bindungsplätzen, bei deren Besetzung mit Anionen unterschiedliche Expansion auftritt.

Die effektive Volumenzunahme ist innerhalb der Fehlergrenzen bei den drei untersuchten Anionen nicht signifikant verschieden; sie hängt nur von der Molalität der gebundenen Ionen, d.h. der Anzahl der gebundenen Ionen ab. Die beobachtete Zunahme des spezifischen Volumens kann somit als eine elektrostatische Expansion des RSA-Moleküls erklärt werden.

Versteht man die untersuchten Mischungen als Modell-Lösungen des Zytoplasmas und legt die dort vorliegenden Konzentrationsverhältnisse zugrunde (75 - 85 Gew.% Wasser,

15 - 20 Gew.% Protein und $0,1 - 0,2 \text{ mol kg}^{-1}$ Salz (60)), so ergibt sich bei der Chloridbindung ein $\Delta V_{3\text{eff}}$ kleiner als $5 \text{ cm}^3 \text{ mol}_b^{-1}$.

5.5.1 Unsicherheiten bei der Bestimmung der effektiven Volumenänderung

Bei der Berechnung der Volumenänderung aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung der gebundenen Anionen mit dem umgebenden Wasser wurde bei den Volumenbeiträgen der einzelnen Ionen auf Literaturwerte zurückgegriffen. Neben der Streuung der experimentellen Daten, die in der Unsicherheit des Koeffizienten s_{11} zum Ausdruck kommt und den in den graphischen Darstellungen angegebenen Fehler ergibt, muß noch der Einfluß der verschiedenen Werte für V_+^O (K^+) bzw. V_-^i (Anion) abgeschätzt werden.

Sieht man von dem Wert für das partielle molare Volumen in unendlicher Verdünnung V_+^O (K^+) von Padova ab (dieser wurde auf der Grundlage von V^O (H^+) = $-0,9 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ gewonnen, was von der Mehrzahl der Autoren abgelehnt wird (22,54,55)), so ergibt sich aus den übrigen Werten eine Abweichung δ von $(\Delta (v/w_1))_{\text{eff}}$ zu größeren bzw. kleineren Werten:

$b_b / \text{mol kg}^{-1}$	$\delta / \text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$	
0,02	$- 2 \cdot 10^{-5}$	$+ 6 \cdot 10^{-6}$
0,07	$- 7 \cdot 10^{-5}$	$+ 2 \cdot 10^{-5}$

Diese Abweichungen liegen noch innerhalb der Fehlergrenzen, die sich aus der experimentellen Unsicherheit in β_{11} ergeben. Auch beeinflussen diese Schwankungen die Steigung aller drei Anionenmeßreihen in gleichem Maß, so daß die Lage der Graphen untereinander unverändert bleibt.

Werden die aus den Ionenradien von Gourary/Adrian berechneten intrinsischen Molvolumen zur Bestimmung der effektiven Volumenänderung herangezogen, so liegen diese Abweichungen ebenfalls innerhalb der Fehlerschranken aus β_{11} :

Für Cl^- ergibt sich bei $b_b = 0,07 \text{ mol kg}^{-1}$ ein

$$\delta = + 8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1};$$

für J^- ergibt sich bei $b_b = 0,07 \text{ mol kg}^{-1}$ ein

$$\delta = + 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}.$$

Bei Zugrundelegung der Pauling'schen Ionenradien treten größere Abweichungen auf: Für Cl^- ergibt sich bei $b_b = 0,07 \text{ mol kg}^{-1}$ ein $\delta = - 0,32 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ und für J^- ein $\delta = - 0,21 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$.

Eine Berechnung des intrinsischen Ionenvolumens in Lösung aus den Pauling-Radien bedeutet auch ein $\Delta V_e > 0$, was jedoch aufgrund der feldstärkeabhängigen Dielektrizitätskonstanten (52) für größere einwertige Ionen nicht zutrifft.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Absolutwerte des spezifischen Volumens hochkonzentrierter H_2O -RSA- und H_2O -RSA-Elektrolyt-Mischungen bei 25°C mit einer Genauigkeit von etwa 0,1 ‰ bestimmt. Der Protein-Massengehalt betrug in der binären Mischung maximal 41%, in den ternären Mischungen etwa 25%. Der Massengehalt wurde über die Trockenmasse nach einer Reihe von Trocknungsverfahren bestimmt. Absolutmessungen der Dichte von Lösungen mit dieser Genauigkeit sind - im Gegensatz zu Dilatometermessungen, bei denen nur relative Änderungen des spezifischen Volumens mit dieser Genauigkeit festgestellt werden können - mit der hier verwendeten Biegeschwingermethode möglich. Dabei muß der viskositätsabhängige systematische Fehler des Densimeters berücksichtigt werden.

Es wurde gezeigt, daß das partielle spezifische Volumen von RSA bis zu einem Massenanteil von 41% unabhängig von der Konzentration ist, und folglich bis zu dieser Konzentration auch keine Wechselwirkung (soweit sie in Dichteänderungen zum Ausdruck kommt) der RSA-Moleküle untereinander auftritt.

Zur Beschreibung des spezifischen Volumens ternärer Mischungen wird eine Entwicklung nach den Massenverhältnissen verwendet, welche eine Separierung der Volumenbeiträge pro Gramm Wasser der einzelnen Komponenten erlaubt. Die Wechselwirkung zwischen Rinderserumalbumin und Anionen wird im Rahmen der Meßgenauigkeit durch einen Wechselwirkungsterm für jeden Ionentyp ausreichend beschrieben.

In der Literatur veröffentlichte Zahlenwerte bezüglich der Änderung des spezifischen Volumens aufgrund hydrophober Wechselwirkung der Anionen mit dem umgebenden

Wasser werden neben den Scatchard'schen Bindungszahlen zur Berechnung eines Korrekturterms und damit einer effektiven Volumenänderung herangezogen. Als Ursache für diese effektive Volumenzunahme wird die Bindung der Anionen an das RSA-Molekül angesehen. Da die absolute Größe dieser Expansion nur von der Molalität der gebundenen einwertigen Ionen, nicht aber von der Ionenart abhängt, kann sie als eine durch elektrostatische Expansion verursachte Strukturänderung des RSA-Moleküls verstanden werden.

Von Hunter (61) wurde ebenfalls das System H_2O -RSA-KCl bei einem Anteil von 5 Gew.% RSA untersucht, jedoch keine Volumenänderung festgestellt. Erst der Übergang zu hohen Proteinkonzentrationen, die Verwendung empfindlicher Dichtemesser und eine exakte Bestimmung der Massenanteile erlaubte es, die auftretenden kleinen Volumenänderungen sichtbar zu machen.

ANHANG

A 1 Viskositätsmessungen

A 1.1 Prinzip der Messung

Die Viskositätsmessungen wurden mit dem Rotationsviskosimeter RV 3 der Firma Haake, Karlsruhe, durchgeführt. Bei diesem Meßverfahren rotiert ein kleiner Zylinder, gut zentriert, in einem feststehenden Außenzylinder. Die Meßsubstanz befindet sich im engen Spalt zwischen beiden Zylindern; der Spalt zwischen Rotor und Stator muß zur Erhaltung eines definierten Schergefälles klein sein. Durch Verändern der Drehzahlen des Rotors können verschiedene Schergefälle eingestellt werden; die Schubspannung wird über das Drehmoment gemessen. Die Viskosität ist das Verhältnis aus Schubspannung und Schergefälle (im Fall reinviskoser Substanzen). Bei dem hier verwendeten Zylindersystem SV SP beträgt die Füllmenge $1,5 \text{ cm}^3$. Die Temperaturkonstanz lag bei $2 \cdot 10^{-2} \text{ K}$. Da RSA-Lösungen reinviskose (Newtonsche) Stoffe darstellen (15), die Viskosität also unabhängig vom Schergefälle ist, kann jede Mischung durch die Angabe eines Viskositätswertes charakterisiert werden; die Aufzeichnung von Viskositäts- oder Fließkurven erübrigt sich in diesem Fall.

A 1.2 Ergebnisse

Es wurden die Viskositäten von RSA-Lösungen bis zu einer Konzentration von 41 Gew.% gemessen; die Viskosität steigt dabei auf 35 000 mPa s an. In Abbildung 17 stellt die durchgezogene Kurve die Viskositätszunahme der salzfreien RSA-Lösung dar. Schon geringe Elektrolytzugaben verringern die Viskosität drastisch: bei $0,61 \text{ mol KCl/kg H}_2\text{O}$ in einer

41%igen RSA-Lösung nimmt sie um nahezu 99% ab; bei einer 20%igen RSA-Lösung beträgt die Abnahme etwa 50%.

Im Rahmen der hier gewählten Konzentrationsverhältnisse (die Messungen dienten nur zur Kalibrierung des Densimeters) kann auch kein Unterschied im Verhalten der Elektrolyte untereinander festgestellt werden. Eine geringe Zugabe von KCl, KJ oder NaJ verringert bereits die Viskosität, während dann eine weitere Erhöhung der Salzmenge nur mehr einen geringen Einfluß auf die Viskositätsveränderung hat.

Abbildung 17: Viskosität der RSA-Lösungen in Abhängigkeit von der RSA-Konzentration α_2 bei 25°C. Die durchgezogene Kurve stellt die Viskosität salzfreier RSA-Lösungen dar. Die Zahlen an den Meßpunkten geben die Salzmolalität an.

□ KCL

△ NaJ

○ KJ

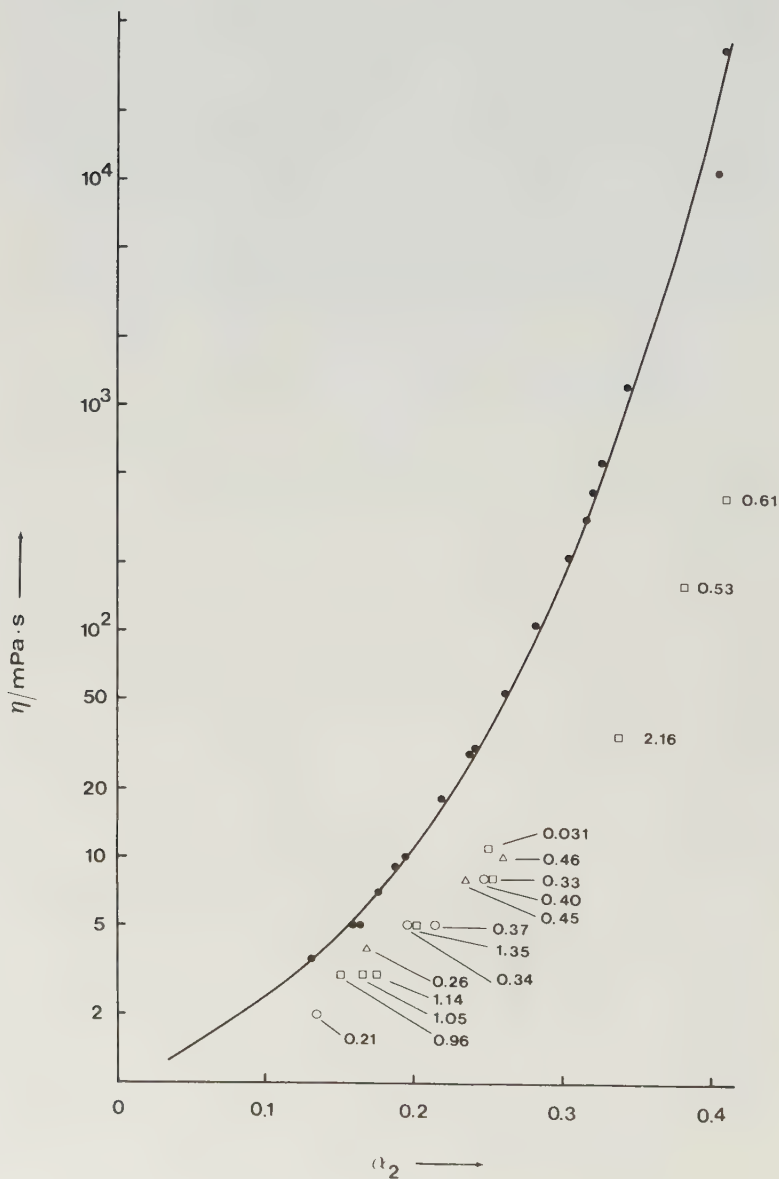


Abbildung 17:

A 2 Meßprinzip des Densimeters

Bei der digitalen Dichtemessung wird die Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten und Gasen auf eine elektronische Frequenzmessung zurückgeführt (3). Die Probe wird in ein schwingfähiges, gebogenes Glasrohr eingefüllt, das zu einer ungedämpften Schwingung senkrecht zur Ebene der V-förmigen Biegung angeregt wird. Bei dem hier verwendeten Typ beträgt die Eigenfrequenz des leeren Schwingers 570 Hz, des mit der Probe gefüllten Schwingers 300 - 400 Hz. Die ungedämpfte Eigenschwingung wird durch ein Paar von Abnahme- und Erregerspulen und einen am Schwinger befestigten Magneten aufrechterhalten. Zur Gewährleistung einer phasenreinen Entdämpfung bei der angegebenen Genauigkeit darf die Masse des Magneten nur wenige Milligramm betragen und die Gegenmasse, an welcher der Glasschwinger eingespannt ist, muß > 25 kg sein (4).

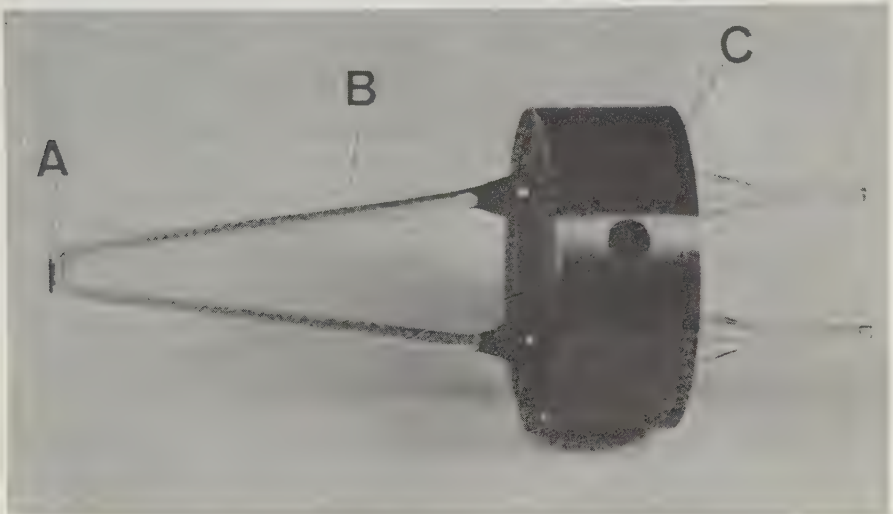


Abbildung 18: Biegeschwinger des Densimeters

B... Quarzschwinger

C... Einspannflansch

A... Abnahme- und Erregermagnet

Für dieses Schwingungsgebilde gilt (4) die klassische Beziehung für die Eigenfrequenz

$$\omega = \frac{c}{m} = \frac{c}{m_0 + \rho V}$$

Die Federkonstante c , die Masse des Glasschwingers m_0 und dessen Volumen V werden durch zwei Eichmessungen mit der bekannten Dichte von Luft und Wasser bestimmt; somit kann die gesuchte Dichte ρ der Probe aus der Eigenfrequenz bestimmt werden.

Diese Beziehungen gelten jedoch nur, solange sich das an der Schwingung teilnehmende Volumen V nicht verändert, d.h., solange die Schwingungsknoten unabhängig von der verwendeten Probensubstanz sind. Nach Kratky et al. (3) ist dies durch den speziellen Aufbau des Schwingers an der Einspannstelle gewährleistet.

Eigene Messungen mit polymerisierendem Methylmethacrylat und vor allem die umfangreichen Untersuchungen von Bernhardt (15) und Heffelfinger (62) zeigten, daß sich bei Viskositäten $> 5 \text{ mPa s}$ signifikante Fehler der gemessenen Dichtewerte ergeben. Diese Abweichungen sind für einen jeden Schwinger eine charakteristische Funktion der Probenviskosität (15). Bei Kenntnis dieser Funktion und Messung der Probenviskosität können somit die densimetrisch ermittelten Dichtewerte korrigiert werden.

A 3 Berechnung der Standardabweichung von Ausgleichskurven

Um die Vertrauensbereiche der Ausgleichskurven, bzw. eines beliebigen Punktes auf der Kurve, zu erhalten, wird die Varianz der entsprechenden Funktion $f(x)$ berechnet.

$$(A\ 1) \quad \sigma^2 (f(x)) = \sigma^2 (\beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2 + \dots + \beta_k x^k)$$

Nach den Rechenregeln für Erwartungswerte erhält man für einen linearen "Fit":

$$(A\ 2) \quad \sigma^2 (\beta_0 + \beta_1 x) = \text{var} (\beta_0) + x^2 \text{var} (\beta_1) + 2 x \text{cov} (\beta_0, \beta_1)$$

bzw. für einen quadratischen Ausgleich:

$$\begin{aligned} (A\ 3) \quad \sigma^2 (\beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2) &= \\ &= \text{var} (\beta_0) + x^2 \text{var} (\beta_1) + x^4 \text{var} (\beta_2) + \\ &+ 2 x \text{cov} (\beta_0, \beta_1) + 2 x^2 \text{cov} (\beta_0, \beta_2) + \\ &+ 2 x^3 \text{cov} (\beta_1, \beta_2) \end{aligned}$$

Es ist also die Kenntnis der Varianz und der Kovarianz der β_i nötig; diese Größen stehen in der Kovarianzmatrix C_b .

Im speziellen Fall des "Least-squares-fitting" erhält man die Kovarianzmatrix als Inverse der Koeffizientenmatrix G_b des Systems der $(k + 1)$ Gleichungen aus der Minimierungsbedingung:

$$(A\ 4) \quad \frac{\partial}{\partial \beta_0} M = \frac{\partial}{\partial \beta_1} M = \dots = \frac{\partial}{\partial \beta_k} M = 0$$

mit

$$(A\ 5) \quad M = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2\sigma_i^2} (y_i - f(x_i))^2 \quad (y_i \dots \text{Meßwert})$$

Die Standardabweichung der Ausgleichskurve ist die Wurzel aus $\sigma^2(f(x))$. Diese Größe wird auch als Restfehler bezeichnet (63). Die in den graphischen Darstellungen angegebenen Fehler sind auf diese Weise berechnet.

Anmerkung:

Im Falle eines linearen Ausgleichs ergibt sich folgende einfache Beziehung für die Kovarianz und den Korrelationskoeffizienten ρ :

$$(A\ 6) \quad \text{cov}(\beta_0, \beta_1) = \rho(\beta_0, \beta_1) \cdot \sigma(\beta_0) \cdot \sigma(\beta_1)$$

A 4 Rechenprogramme zur Datenanalyse

Die für die Ausgleichskurven der Meßdaten verwendeten Polynom-Fit-Programme sind in Anlehnung an die von Bevington (64) und Brandt (63) veröffentlichten FORTRAN-IV-Quellenprogramme entstanden. Alle Meßwerte sind auf Lochstreifen gesichert; die Auswertung wurde an der PDP-11-Rechenanlage des Instituts für Radiologie vorgenommen. Für die Korrektur der Densimeterdaten wurde ein Hewlett-Packard-Rechner 9100 A verwendet.

Zusammenstellung häufig verwendeter Symbole

Indizes: 1 Komponente 1: Wasser
 2 Komponente 2: Protein
 3 Komponente 3: Salz

α_1 Wasser-Massenanteil in der Mischung Salz-Wasser

$$\alpha_1 = \frac{m_1}{m_1 + m_3}$$

α_2 Protein-Massenanteil in der Mischung Wasser-Protein

$$\alpha_2 = \frac{m_2}{m_1 + m_2}$$

α_3 Salz-Massenanteil in der Mischung Salz-Protein

$$\alpha_3 = \frac{m_3}{m_2 + m_3}$$

b_2 Molalität der Komponente 2

b_3 Molalität der Komponente 3

b_b Molalität gebundener Ionen

b $\equiv b_3$

d Dichte

m_i ($i = 1, 2, 3$) Masse der Komponente i

M_2 relative Molekülmasse der Komponente 2

M_3 relative Molekülmasse der Komponente 3

N_A	Avogadro-Konstante
v	spezifisches Volumen
V	Volumen
v_1^O	spezifisches Volumen von Wasser
v_2^∞	partiellcs spezifisches Volumen der Komponente 2 in unendlicher Verdünnung
v_3^∞	partiellcs spezifisches Volumen der Komponente 3 in unendlicher Verdünnung
$v_3^{\infty-}$	partiellcs spezifisches Volumen der Anionen in unendlicher Verdünnung
$v_3^{\infty+}$	partiellcs spezifisches Volumen der Kationen in unendlicher Verdünnung
v_O^O	partiellcs molares Volumen der Komponente 3 in unendlicher Verdünnung
v_-^O	partiellcs molares Volumen der Anionen in un- endlicher Verdünnung
v_+^O	partiellcs molares Volumen der Kationen in unendlicher Verdünnung
v^O	identisch v_-^O
v^i	intrinsisches molares Volumen der Anionen
ΔV_3	molare Volumenzunahme bei der Bindung von Anionen
ΔV_e	molare Volumenänderung aufgrund von Elektro- striktion oder hydrophober Wechselwirkung

w_i ($i = 1, 2, 3$) Massenbruch der Komponente i

$$w_i = \frac{m_i}{m_1 + m_2 + m_3}$$

η Viskosität

ϕ_i ($i = 2, 3$) scheinbares spezifisches Volumen der Komponente 2, 3

ζ_i ($i = 2, 3$) Massenverhältnis $\zeta_i = \frac{m_i}{m_1}$

ν Zahl der von einem Proteinmolekül im Mittel gebundenen Anionen des zugesetzten Salzes

Tabellen aller Meßergebnisse

1. Wasser-NaJ

$v/\text{cm}^3\text{g}^{-1}$	m_1/mg	m_2/mg	m_3/mg
0.999750	3003.53	0.00	12.64
0.997887	3012.23	0.00	20.11
0.994989	3015.37	0.00	31.78
0.992810	3013.35	0.00	40.39
0.990161	3014.92	0.00	51.13
0.988050	3006.72	0.00	59.68
0.983254	3030.59	0.00	80.08
0.978797	3018.65	0.00	98.57
0.973660	3007.64	0.00	119.97
0.956065	3013.81	0.00	197.37
0.943954	2999.62	0.00	251.97
0.933671	2992.90	0.00	299.74
0.916040	3034.88	0.00	392.18
0.896502	3014.25	0.00	492.58

2. Wasser-KCl

$v/\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	m_1/mg	m_2/mg	m_3/mg
0.991222	19384.54	0.00	369.02
0.991511	19537.72	0.00	329.84
0.993551	19732.72	0.00	299.20
0.995191	19686.41	0.00	245.51
0.995503	19417.16	0.00	232.18
0.996067	19892.20	0.00	219.65
0.996861	21039.57	0.00	204.92
0.996839	19812.23	0.00	193.52
0.997413	19389.34	0.00	171.15
0.997853	19732.85	0.00	159.35
0.998219	19898.40	0.00	150.28
0.998690	20821.64	0.00	140.96
0.998782	19851.01	0.00	131.54
0.999235	20539.92	0.00	120.80
0.999912	20593.92	0.00	99.43
1.000140	20324.97	0.00	90.88
1.000384	20001.96	0.00	81.47
1.000763	20041.24	0.00	69.78
1.001018	20054.23	0.00	61.64
1.001475	19969.43	0.00	46.55
1.001696	20760.67	0.00	40.93
1.001913	20560.54	0.00	33.61
1.001413	20581.49	0.00	49.28
1.001777	20541.73	0.00	37.30
1.002152	19725.53	0.00	25.02
1.002591	19374.05	0.00	11.27
1.002353	19808.90	0.00	18.82
1.002498	20034.38	0.00	14.61
1.002104	19412.38	0.00	26.08
1.002309	19991.13	0.00	20.18
1.002208	19770.26	0.00	23.31
1.002408	19448.32	0.00	16.86
0.992799	19552.93	0.00	320.42
0.992377	20360.52	0.00	348.25
0.992991	20888.08	0.00	335.13
0.992147	20717.13	0.00	361.77
0.991591	20242.99	0.00	372.41
0.991015	20549.52	0.00	397.71
0.989802	20381.70	0.00	435.28
0.989547	20639.05	0.00	450.08
0.988441	19945.36	0.00	472.31
0.989836	19834.35	0.00	422.96
0.991185	19937.46	0.00	380.05
0.990109	19633.80	0.00	409.59
0.988496	19490.97	0.00	459.78
0.987875	19451.80	0.00	478.37
0.987824	19860.66	0.00	490.36

2. Wasser-KCl

ν/cm^{-1}	m_1/mg	m_2/mg	m_3/mg
1.001905	19710.79	0.00	31.98
1.001373	19649.07	0.00	48.58
1.000930	19579.50	0.00	62.90
1.001379	19656.69	0.00	49.15
0.988403	4114.01	0.00	97.49
0.988320	4002.09	0.00	95.39
0.989272	4006.30	0.00	89.17
0.989990	4013.11	0.00	84.56
0.991635	4006.25	0.00	73.10
0.992677	4129.78	0.00	68.19
0.993505	4006.00	0.00	60.71
0.994487	4018.16	0.00	54.59
0.995529	4066.81	0.00	48.23
0.996320	3998.29	0.00	42.46
0.998225	2019.16	0.00	15.37
0.993835	2032.74	0.00	30.05
0.984723	2014.73	0.00	60.31
0.980460	2018.59	0.00	75.32
0.976411	2014.79	0.00	89.77
0.971930	2016.66	0.00	106.06
0.970179	2022.76	0.00	113.02
0.962888	2007.94	0.00	139.39
0.956523	2027.46	0.00	165.41
0.952641	2024.30	0.00	180.62
0.948867	2022.14	0.00	195.78
0.945219	2020.18	0.00	210.45
0.941721	2024.59	0.00	225.80
0.938004	2019.83	0.00	241.07

3. Wasser-KJ

$\nu/\text{cm}^3\text{g}^{-1}$	m_1/mg	m_2/mg	m_3/mg
1.000301	3008.71	0.00	11.02
0.997598	3018.72	0.00	22.43
0.995682	3000.37	0.00	30.41
0.992996	3006.90	0.00	41.69
0.990862	2999.45	0.00	50.64
0.988935	3004.43	0.00	59.12
0.979842	2973.14	0.00	97.73
0.974706	3015.03	0.00	122.00
0.970533	3007.74	0.00	140.68
0.949759	2993.74	0.00	237.19
0.930449	3003.05	0.00	334.53
0.911741	3031.79	0.00	438.10
0.897845	3026.30	0.00	516.22
0.884866	3010.38	0.00	589.84
0.863286	3008.48	0.00	724.77

4. Wasser-KSCN

$\nu/\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	m_1/mg	m_2/mg	m_3/mg
1.002182	3063.89	0.00	4.75
1.001430	3016.34	0.00	9.60
1.000502	3086.96	0.00	15.71
0.999606	3007.23	0.00	21.21
0.998755	3041.06	0.00	26.56
0.998135	3011.13	0.00	30.26
0.996606	3013.13	0.00	40.12
0.994670	3006.08	0.00	52.27
0.993241	2992.51	0.00	61.38
0.990371	3002.42	0.00	80.44
0.987375	3021.19	0.00	101.30
0.979580	2991.61	0.00	153.12
0.975819	3009.48	0.00	180.84
0.971160	3009.79	0.00	214.95

5. Wasser-RSA

ν/cm^{-1}	m_1/mg	m_2/mg	m_3/mg
0.998726	980.11	15.67	0.00
0.995623	983.45	27.66	0.00
0.994000	942.07	32.46	0.00
0.990678	931.34	44.70	0.00
0.984719	881.49	64.33	0.00
0.983058	924.32	74.02	0.00
0.979999	907.67	84.92	0.00
0.978575	884.15	88.37	0.00
0.977340	898.26	94.84	0.00
0.976545	867.21	94.73	0.00
0.974719	883.39	103.86	0.00
0.970213	856.09	119.09	0.00
0.969450	835.68	119.36	0.00
0.967920	851.65	127.98	0.00
0.965554	843.46	136.34	0.00
0.962200	823.20	147.03	0.00
0.963241	853.57	148.45	0.00
0.962736	830.84	146.47	0.00
0.958458	805.91	160.28	0.00
0.957961	812.88	163.45	0.00
0.955010	784.58	170.54	0.00
0.951703	779.77	184.24	0.00
0.948970	789.27	198.86	0.00
0.945742	756.07	204.64	0.00
0.932137	708.63	253.78	0.00
1.002754	953.92	0.79	0.00
1.002635	982.41	1.10	0.00
1.002458	945.89	1.66	0.00
1.002165	924.12	2.80	0.00
1.002048	936.81	3.14	0.00
1.001642	938.70	4.72	0.00
1.001370	943.33	5.52	0.00
1.000560	923.96	8.33	0.00
0.999960	932.06	10.50	0.00
0.999678	918.41	11.41	0.00
0.999204	929.21	13.08	0.00
0.998355	918.48	15.78	0.00
0.997691	910.42	18.15	0.00
0.997056	947.66	21.17	0.00
0.995502	942.81	26.78	0.00
0.994363	886.35	29.24	0.00
0.991856	909.11	39.18	0.00
0.987107	902.86	56.49	0.00
0.985020	892.80	63.76	0.00
0.983280	890.31	70.22	0.00
0.980348	879.28	80.67	0.00
0.980264	873.16	80.39	0.00

5. Wasser-RSA

ν/cm^{-1}	m_1/mg	m_2/mg	m_3/mg
0.980658	887.15	80.25	0.00
0.979227	871.19	84.45	0.00
0.977939	837.61	85.81	0.00
0.977656	851.33	88.25	0.00
0.977260	838.72	88.50	0.00
0.976578	841.91	91.44	0.00
0.975500	846.88	96.20	0.00
0.974996	861.19	99.79	0.00
0.974955	847.65	98.51	0.00
0.972352	864.74	111.18	0.00
0.969473	864.46	123.13	0.00
1.001037	951.92	6.87	0.00
1.000185	954.38	9.95	0.00
0.998048	943.11	17.47	0.00
0.995621	936.25	26.34	0.00
0.993344	902.48	33.39	0.00
0.993216	937.78	35.20	0.00
0.990671	908.24	43.50	0.00
0.989381	882.50	46.78	0.00
0.984939	888.86	63.83	0.00
0.982830	860.83	69.58	0.00
0.983326	878.18	69.25	0.00
0.978861	880.35	86.67	0.00
0.973529	829.49	102.22	0.00
0.973372	865.62	107.04	0.00
0.972685	816.84	103.43	0.00
0.972460	848.45	108.33	0.00
0.971880	851.03	111.25	0.00
0.967414	827.65	125.97	0.00
0.960518	824.81	154.71	0.00
0.959794	789.24	150.76	0.00
0.955343	763.73	164.51	0.00
0.952270	739.53	171.78	0.00
0.950502	744.70	180.55	0.00
0.943917	737.95	207.53	0.00
0.938562	712.59	224.34	0.00
0.937855	678.99	216.73	0.00
0.932247	680.27	242.28	0.00
0.926167	640.88	255.39	0.00
0.920156	627.84	278.01	0.00
0.917758	588.81	272.64	0.00
0.916100	610.16	290.00	0.00
0.914688	621.70	303.39	0.00
0.914673	635.37	310.76	0.00
0.892908	548.89	379.66	0.00
0.893144	549.69	380.41	0.00
0.892223	572.26	400.78	0.00

6. Wasser-RSA-KCl

$v/\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	m_1/mg	m_2/mg	m_3/mg
0.934502	769.62	257.00	1.77
0.933592	767.78	256.38	3.56
0.931355	756.78	252.71	7.86
0.927671	750.42	250.59	14.71
0.928950	729.57	243.63	11.67
0.925465	737.59	246.30	18.42
0.922901	717.21	239.50	22.55
0.919878	706.72	236.00	27.69
0.918741	690.13	230.46	29.22
0.915719	697.87	233.04	35.01
0.914626	687.22	229.48	36.80
0.912722	690.91	230.72	40.52
0.909735	680.33	227.18	45.58
0.908075	677.22	226.14	48.23
0.906166	673.44	224.88	51.93
0.902522	674.08	225.10	58.67
0.902255	664.86	222.02	58.60
0.900994	662.81	221.33	61.05
0.899359	661.17	220.79	63.79
0.897650	653.98	218.38	66.46
0.907921	702.71	176.67	70.66
0.907894	719.06	180.93	72.36
0.913191	726.08	169.02	67.60
0.918669	736.51	157.63	63.05
0.923680	749.80	147.83	59.12
0.929644	777.39	138.77	55.50
0.934666	800.65	130.69	52.27
0.939595	767.89	114.70	45.87
0.945072	810.88	107.62	43.05
0.950382	835.97	99.17	39.67
0.955726	827.68	86.80	34.72
0.961095	859.54	78.37	31.35
0.966498	861.93	67.29	26.92
0.971353	883.09	58.61	23.44
0.978635	898.14	44.68	17.87
0.982844	899.47	37.07	14.83
0.993488	939.16	17.83	7.13
0.999538	975.74	6.45	2.58

6. Wasser-RSA-KCl

ν/cm^{-1}	m_1/mg	m_2/mg	m_3/mg
0.956049	836.16	117.72	22.64
0.960419	804.61	100.99	19.43
0.963284	817.67	94.78	18.23
0.967008	817.33	84.60	16.28
0.974443	822.58	65.85	12.67
0.979322	831.16	54.32	10.45
0.988745	889.03	33.76	6.49
0.991057	893.16	28.23	5.43
0.995891	901.05	16.70	3.21
0.998402	915.30	0.68	2.05
1.000524	2003.32	12.45	2.40
0.977294	866.70	27.94	25.85
0.975234	858.21	35.25	25.59
0.972744	852.10	44.37	25.41
0.969377	850.32	57.83	25.36
0.968145	867.38	63.99	25.87
0.965752	820.99	70.04	24.48
0.961428	826.27	88.23	24.64
0.957957	812.70	100.78	24.24
0.957707	816.09	102.39	24.34
0.961095	859.54	78.37	31.35
0.966498	861.93	67.29	26.92
0.971353	883.09	58.61	23.44
0.978635	898.14	44.68	17.87
0.982844	899.47	37.07	14.83
0.993488	939.16	17.83	7.13
0.999538	975.74	6.45	2.58
0.934502	769.62	257.00	1.77
0.933592	767.78	256.38	3.56
0.931355	756.78	252.71	7.86
0.878831	568.38	401.07	25.75
0.878831	580.98	410.36	26.34
0.878831	567.17	399.97	25.68
0.888240	604.94	373.83	24.00
0.888240	607.01	374.49	24.04
0.888240	617.90	381.04	24.46
0.888240	603.08	372.55	23.92

7. Wasser-RSA-KJ

$\nu/\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	m_1/mg	m_2/mg	m_3/mg
0.901249	673.43	222.26	50.67
0.906166	637.12	196.37	44.77
0.914613	669.83	182.50	41.61
0.921496	710.33	173.73	39.61
0.926508	705.22	158.94	36.24
0.931262	758.74	157.57	35.93
0.936019	741.51	141.41	32.24
0.946369	789.68	122.60	27.95
0.951542	817.03	113.40	25.86
0.954425	809.62	104.98	23.93
0.958931	827.78	95.81	21.85
0.950335	795.68	113.42	25.86
0.967575	847.51	76.61	17.47
0.971018	860.62	69.59	15.86
0.981528	883.32	46.44	10.59
0.984864	906.66	39.79	9.07
0.988932	909.73	30.98	6.98
0.995242	927.32	16.91	3.85

8. Wasser-RSA-NaJ

$\nu/\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	m_1/mg	m_2/mg	m_3/mg
0.898785	706.29	254.15	48.78
0.898827	684.76	246.08	47.23
0.898789	632.26	227.13	43.60
0.903958	672.59	224.88	43.16
0.909177	684.36	212.43	40.78
0.914201	703.44	202.61	38.89
0.919137	719.57	191.96	36.85
0.925237	727.67	175.88	33.76
0.929631	718.38	161.30	30.96
0.935067	756.19	153.97	29.56
0.934772	709.69	145.01	27.83
0.940264	748.92	138.19	26.53
0.944515	788.43	133.71	25.66
0.949527	786.32	119.66	22.97
0.953418	793.47	110.42	21.19
0.960603	811.60	94.26	18.09
0.965990	838.87	83.53	16.03
0.970853	877.69	74.78	14.35
0.977549	875.76	57.78	11.08
0.981315	872.91	48.50	9.31
0.983328	889.71	44.72	8.58
0.992514	899.90	23.29	4.47
0.997079	937.26	13.53	2.60

9. Wasser-RSA-KSCN

$\nu/\text{cm}^3\text{g}^{-1}$	m_1/mg	m_2/mg	m_3/mg
0.915210	731.58	228.59	58.84
0.915182	699.59	219.44	56.49
0.923980	710.24	192.23	49.48
0.932309	734.18	171.29	44.09
0.940270	791.94	158.63	40.84
0.944187	779.26	144.37	37.16
0.949590	795.48	130.82	33.68
0.952673	802.55	122.59	31.56
0.957994	830.87	111.10	28.60
0.962166	834.24	99.66	25.66
0.967103	852.13	87.74	22.59
0.970523	855.21	78.41	20.18
0.976202	871.05	64.93	16.72
0.980335	901.52	56.18	14.46
0.983319	893.44	47.44	12.21
0.989920	936.64	31.96	8.23
0.994189	944.89	23.27	5.48
0.997647	957.02	12.92	3.33
0.987186	1470.60	50.46	22.19
0.987188	1470.60	50.46	22.19
0.987189	1470.60	50.46	22.19
0.987180	1470.60	50.46	22.19

Literaturverzeichnis

- 1 Th. Bull, J.-E. Norne et al.:
Nuclear Magnetic Resonance Studies of Chloride
Binding to Proteins,
J. Am. Chem. Soc. 100, 4643 (1978)
- 2 H. Pfister:
Das chemische Potential von Kaliumchlorid in
konzentrierten Proteinlösungen - ein Beitrag
zum Verständnis des thermodynamischen Zu-
standes des Zytoplasmas,
Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg
(1971)
- 3 O. Kratky, H. Leopold, H. Stabinger:
Dichtemessungen an Flüssigkeiten und Gasen
auf 10^{-6} g/cm³ bei 0,6 cm³ Präparatvolumen,
Z. angew. Physik, 27. Bd., Heft 4, 273 (1969)
- 4 H. Leopold:
Die digitale Messung der Dichte von Flüssig-
keiten,
Elektronik, 19. Jhg., Nr. 9, Sept. 1970
- 5 O. Kratky, H. Leopold, H. Stabinger:
The Determination of the Partial Specific
Volume of Proteins by the Mechanical Oscillator
Technique,
Enzyme Structure, Methods in Enzymology,
Vol. 27, Part D 1973, 98-110, Acad. Press
- 6 R.C. Weast:
Handbook of Chemistry and Physics,
46th Edition, Cleveland, 1965

- 7 P.H. Bigg:
Density of water in SI units over the range
0 - 40°C,
Brit. J. Appl. Phys., 1967, Vol. 18, 521
- 8 J. Bernhardt, H. Pauly:
Partial Specific Volumes in Highly Concentrated
Protein Solutions. I. Water-Bovine Serum
Albumin and Water-Bovine Hemoglobin,
J. Phys. Chem. 79, 584 (1975)
- 9 J. Bernhardt, H. Pauly:
Partial Specific Volumes in Highly Concentrated
Protein Solutions. II. Mixtures of Water, Bovine
Hemoglobin, and Sodium Chloride,
J. Phys. Chem. 81, 1290 (1977)
- 10 J. Bernhardt:
Dichtemessungen an biologischen Zellen und an
Zell-Modellen,
Habilitationsschrift, Erlangen, 1977
- 11 K. Kretschmer, Chr. Pachaly:
Vorschlag zur Standardisierung von Konzentra-
tionsbestimmungen an Proteinen, besonders für
die Ermittlung partieller spezifischer
Volumina,
studia biophysica, Bd. 38/1, 55-63 (1973)
- 12 S.H. Armstrong:
J. Am. Chem. Soc. 69, (1947), 1747
- 13 J. Berthon, F. Cesbron, A. Laurent:
J. Mol. Biol. 71 (1972), 809
- 14 M. Hunter:
J. Phys. Chem. 70 (1966) 3285

- 15 J. Bernhardt, H. Pauly:
Pycnometric vs. Densimetric Measurements of
Highly Viscous Protein Solutions,
J. Phys. Chem. (1980), 84, 158-162
- 16 W.G. McMillan, J.E. Mayer:
The Statistical Thermodynamics of Multicomponent
Systems,
J. Chem. Phys. 13/7, 276 (1945)
- 17 T.L. Hill:
Statistical Mechanics, Principles and Selected
Applications,
McGraw-Hill Book Company, 1956
- 18 D. Stigter:
Interactions in Aqueous Solutions. II. Osmotic
Pressure and Osmotic Coefficient of Sucrose
and Glucose Solutions,
J. Phys. Chem. 64, 118 (1960)
- 19 J.J. Kozak, W.S. Knight, W. Kauzmann:
Solute-Solute Interactions in Aqueous Solutions,
J. Chem. Phys. 48/2, 675 (1968)
- 20 O. Redlich, D.M. Meyer:
The Molal Volumes of Electrolytes,
Chem. Rev. 64/3, 221, (1964)
- 21 J.E. Desnoyers, M. Arel, G. Perron, C. Jolicoeur:
Apparent Molal Volumes of Alkali Halides in
Water at 25^o. Influence of Structural
Hydration Interactions on the Concentration
Dependence,
J. Phys. Chem. 73/10, 3346, (1969)

- 22 F.J. Millero:
The Molal Volumens of Electrolytes,
Chem. Rev. 71/2, 147 (1971)
- 23 H.S. Harned, B.B. Owen:
The Physical Chemistry of Electrolytic
Solutions,
Reinhold Publishing Corporation, New York, 1958
- 24 E.A. Guggenheim:
Thermodynamics,
North-Holland Publishing, Amsterdam, 1967
- 25 D.O. Masson:
Phil. Mag., 8, 218 (1929)
- 26 H.B. Bull, K. Breese:
J. Phys. Chem. 72, 1817 (1968)
- 27 M.O. Dayhoff, G.E. Perlmann, D.A. Mac Innes:
The Partial Specific Volumes, in Aqueous
Solution, of Three Proteins,
J. Am. Chem. Soc. 74, 2515, (1952)
- 28 K. Gekko, H. Noguchi:
Compressibility of Globular Proteins in
Water at 25°C,
J. Phys. Chem. 83/21, 2706 (1979)
- 29 G. Kortüm:
Lehrbuch der Elektrochemie,
Verlag Chemie, Weinheim, 1966
- 30 F. Vaslow:
The Apparent Molal Volumes of the Alkali
Metal Chlorides in Aqueous Solution and
Evidence for Salt-Induced Transitions,
J. Phys. Chem. 70/7, 2286 (1966)

- 31 L.A. Dunn:
Apparent Molar Volumes of Electrolytes, Part 1,
Trans. Far. Soc. 62, 2348 (1966)
- 32 L.A. Dunn:
Apparent Molar Volumes of Electrolytes, Part 2,
Trans. Far. Soc. 64, 1898 (1968)
- 33 H.L. Friedman, C.V. Krishnan:
Thermodynamics of Ionic Hydration, in:
Water Vol. 3, ed. by F. Franks,
Plenum Press, New York, 1973
- 34 S. Katz, J.K. Crissman, L.C. Roberson:
Volume Effects Produced by Protein-Ion-Inter-
action,
J. Biol.Chem. 249/24, 7892 (1974)
- 35 G. Scatchard, I.H. Scheinberg, S.H. Armstrong:
Physical Chemistry of Protein Solutions.
IV. The Combination of Human Serum Albumin
with Chloride Ion,
J. Am. Chem. Soc., 72, 535 (1950)
- 36 G. Scatchard, I.H. Scheinberg, S.H. Armstrong:
Physical Chemistry of Protein Solutions.
V. The Combination of Human Serum Albumin
with Thiocyanate Ion,
J.Am. Chem. Soc. 72, 540 (1950)
- 37 G. Scatchard, J.S. Coleman, A.L. Shen:
Physical Chemistry of Protein Solutions.
VII. The Binding of Some Small Anions to
Serum Albumin,
J.Am. Chem. Soc. 79, 12 (1956)

- 38 G. Scatchard, Y.V. Wu, A.L. Shen:
Physical Chemistry of Protein Solutions.
X. The Binding of Small Anions by Serum
Albumin,
J.Am. Chem. Soc. 81, 6104 (1959)
- 39 G. Scatchard, W.T. Yap:
The Physical Chemistry of Protein Solutions.
XII. The Effects of Temperature and Hydroxide
Ion on the Binding of Small Anions to Human
Serum Albumin,
J.Am. Chem. Soc. 86, 3434 (1964)
- 40 J. Rasper, W. Kauzmann:
Volume Changes in Protein Reactions.
I. Ionization Reactions of Proteins,
J.Am. Chem. Soc. 84, 1771 (1962)
- 41 W. Kauzmann, A.Bodanszky, J. Rasper:
Volume Changes in Protein Reactions.
II. Comparison of Ionization Reactions in
Proteins and Small Molecules,
J.Am. Chem. Soc. 84, 1777 (1962)
- 42 M.D. Reboiras, H. Pfister, H. Pauly:
Activity Coefficients of Salts in Highly
Concentrated Protein Solutions,
Biophys. Chem. (in Druck)
- 43 Th.E. Bull, B. Halle, B. Lindman:
Internal Motion at the Chloride Binding Sites
of Human Serum Albumin by NMR Relaxation
Studies,
FEBS Letters, 86/1, 25 (1978)
- 44 J. Padova:
Solvation Approach to Ion Solvent Interaction,
J. Chem. Phys. 40/3, 691 (1964)

- 45 Ch.W. Carr:
Studies on the Binding of Small Ions in Protein
Solutions with the Use of Membrane Electrodes.
III. The Binding of Chloride Ions in Solutions
of Various Proteins,
Arch. Biochem. Biophys. 46, 417 (1953)
- 46 Ch.W. Carr:
Studies on the Binding of Small Ions in Protein
Solutions with the Use of Membrane Electrodes.
VI. The Binding of Sodium and Potassium Ions
in Solutions of Various Proteins,
Arch. Biochem. Biophys. 62/2, 476 (1956)
- 47 Ch. Tanford, S.A. Swanson, W.S. Shore:
Hydrogen Ion Equilibria of Bovine Serum Albumin,
J.Am. Chem. Soc. 77, 6414 (1955)
- 48 J. Steinhardt, J.A. Reynolds:
Multiple Equilibria in Proteins,
Academic Press, New York, 1969
- 49 B.E. Conway:
Some Aspects of the Thermodynamic and
Transport Behavior of Elektrolytes, in:
Physical Chemistry, Vol. IX A,
Academic Press, New York, 1970
- 50 F.J. Millero:
The Partial Molal Volume of Ions in Various
Solvents,
J. Phys. Chem. 73/7, 2417 (1969)
- 51 F.J. Millero:
Apparent Molal Expansibilities of Some
Divalent Chlorides in Aqueous Solution at 25°C,
J.Phys. Chem. 72/13, 4589 (1968)

- 52 J. Padova:
Ion-Solvent Interaction. II. Partial Molar
Volume and Electrostriction: a Thermodynamic
Approach,
J. Chem. Phys. 39/6, 1552 (1963)
- 53 H. Frank, W.Y. Wen:
Disc. Faraday Soc. 24, 133 (1967)
- 54 P. Mukerjee:
On Ion-Solvent Interactions. Part II.
Internal Pressure and Electrostriction of
Aqueous Solutions of Electrolytes,
J. Phys. Chem. 65, 744 (1961)
- 55 P. Mukerjee:
Ionic Partial Molal Volumes and Electrostrictions
in Aqueous Solutions,
J. Phys. Chem. 70, 2708 (1966)
- 56 R. Zana, E. Yeager:
Ultrasonic Vibration Potentials and Their
Use in the Determination of Ionic Partial
Molal Volumes,
J. Phys. Chem. 71/3, 521 (1966)
- 57 B.E. Conway, R.E. Verrall, J.E. Desnoyers:
Specificity in Ionic Hydration and the
Evaluation of Individual Ionic Properties,
Z. phys. Chem. 230, 3/4, 157 (1965)
- 58 B.S. Gourary, F.J. Adrian:
Solid State Phys. 10, 127 (1960)
- 59 P. Diehl, E. Fluck, R. Kosfeld:
NMR 12. Basic Principles and Progress,
Springer, Berlin

- 60 G. Hasl:
Kalorische Untersuchungen an Zell-Modellen
und biologischen Zellen,
Habilitationsschrift, Erlangen, 1973
- 61 M.J. Hunter:
The Partial Specific Volume of Bovine Plasma
Albumin in the Presence of Potassium Chloride,
J. Phys. Chem., 71/12, 3717 (1967)
- 62 G.P. Heffelfinger:
Density Meter - A New Approach to Measuring
Sweetener Solution Solids,
Proc. of 23th Ann.Meeting Soc. Soft Drink
Technologists, Phönix (Ariz.) 1976
- 63 S. Brandt:
Datenanalyse,
Bibl. Inst. Mannheim, 1975
- 64 Ph. R. Bevington:
Data Reduction and Error Analysis for the
Physical Sciences,
McGraw-Hill Book, New York, 1969
- 65 G. Curthoys, J.G. Mathieson:
Partial Molal Volumes of Ions,
Trans. Far. Soc. 565/66, 43 (1970)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.Dr.H.Pauly für die Themenstellung zu dieser Arbeit. Seine kritischen, aber wohlwollenden Anregungen waren eine gründliche Anleitung zu selbständiger wissenschaftlicher Tätigkeit.

Zu danken habe ich auch Herrn Priv.-Doz. Dr.J.Bernhardt für seine stete Bereitschaft zu Gesprächen und für manchen nützlichen Hinweis bei der Herstellung der Proben.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof.Dr. K.Müller, Herrn Prof.Dr.R.Helbig und Herrn Prof.Dr.K.Heinz vom Institut für Angewandte Physik für das Interesse, das sie meiner Arbeit entgegengebracht haben und für ihre wohlwollende Unterstützung.

Mein Dank gilt auch allen Freunden und Kollegen am Institut für Radiologie für die für eine erfolgreiche Tätigkeit so wichtige freundschaftliche Atmosphäre am Institut.

Frau G.Heer danke ich für die gewissenhafte und saubere Erstellung des Manuskripts.

Lebenslauf

Eltern:	Dr. Gerhard Nopitsch, Steuerberater, Christine Nopitsch, geb. Weihand
Geboren	am 30. 10. 1947 in Nürnberg
1954 - 58	Volksschule in Nürnberg
1958 - 69	Realgymnasium bzw. Willstätter-Gymnasium in Nürnberg, Abitur am 28. 6. 1969
WS 1969/70	Beginn mit dem Studium der Physik in Erlangen
SS 1974	1. Teil der Diplom-Hauptprüfung
SS 1974 - SS 1976	Diplomarbeit am Institut für Angewandte Physik/Lehrstuhl für Festkörperphysik der Universität Erlangen-Nürnberg
SS 1976	Diplom-Hauptprüfung am 23. 7. 1976
seit Januar 1977	Doktorarbeit am Institut für Radiologie der Universität Erlangen-Nürnberg

